



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Terra Ubertima Mors Aperta

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Bebida fermentada no convencional de una infusión estandarizada de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) utilizando bacterias ácido lácticas probióticas”

TESIS

Presenta:

Harry Eviel Manzanilla Herrera

Para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

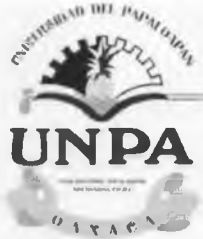
Director:

Dr. Cirilo Nolasco Hipólito

Codirector:

Dr. Octavio Carvajal Zarrabal

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, 2023



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 07 de marzo de 2023 a las 16:15 h, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "Bebidas fermentadas no convencionales de una infusión estandarizada de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) utilizando bacterias ácido lácticas probióticas" presentada por el alumno **Harry Eviel Manzanilla Herrera**, con número de matrícula 17090304, aspirante al título de **Licenciatura**.

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que el aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 07 de marzo de 2023.

ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Cirilo Nolasco Hipólito
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis

Dr. Octavio Carvajal Zarrabal
Profesor Investigador Titular "C"
Universidad Veracruzana
Co-Director de Tesis

Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Profesor Investigador Titular "B"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. Lucio Abel Vázquez León
Investigador por México CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Investigadora por México CONACyT-UNPA
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis

Dr. María de Jesús García Gómez
Profesor Investigador Titular "A"
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Tuxtepec, Oaxaca, a 10 de marzo del 2023
Oficio No. JCIB/002/03/2023

M.E Yesenia Barrientos Arenal
Jefa de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis del alumno **Harry Eviel Manzanilla Herrera** con título final **“Bebidas fermentadas no convencionales de una infusión estandarizada de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) utilizando bacterias ácido lácticas probióticas”**, para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

- Presidente: Dra. Jacqueline Capataz Tafur (Universidad del Papaloapan)
- Secretario: Dr. Lucio Abel Vázquez León (Universidad del Papaloapan)
- Vocal: Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia (Universidad del Papaloapan)
- Primer Suplente: Dra. María de Jesús García Gómez (Universidad del Papaloapan)
- Segundo Suplente: Dra. Rubí Guadalupe Utrilla Coello (Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente

*Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú*



Dra. Jacqueline Capataz Tafur
Jefa de Carrera de Ingeniería en Biotecnología
Universidad del Papaloapan

c.c.p. Dr. Cirilo Nolasco Hipólito. Director de tesis. Para su conocimiento
c.c.p. Harry Eviel Manzanilla Herrera. Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

Vo.Bo. M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



Hoja de originalidad

El presente trabajo ha sido aceptado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

Con especial dedicatória:

A mi adorada madre la que siempre me motivase a seguir adelante con mis estudios y a no rendirme por más duro que fuera el camino y que los tropiezos son parte de la vida, a mi abuela adorada que estuvo apoyándome y preocupándose de mi salud, a mi hermano por darme la inspiración para estudiar la facultad orientándome durante mis estudios, por ultimo pero no menos importante a mi señor y querido padre quien en vida me apoyase , disciplinase y enseñase el valor de la vida y lo que vale verdaderamente esforzarse y disfrutar de los sacrificios, a toda mi familia los amo mucho y hasta el cielo a todos mis seres queridos que estuvieron conmigo.

Agradecimientos...

Antes que nada quiero dar mi gratitud al creador del firmamento, el altísimo, pues gracias al supremo fue posible navegar en esta travesía llamada vida, encaminarme y llegar a donde estoy aunque no sea el final de mi camino, a todos mis profesores(as) a lo largo de mi formación académica y profesional, con sumo respeto y admiración al gran profesor Ernesto Gonzales Cervantes mi mentor de vida quien me enseñase el valor del conocimiento, al entrañable doctor Mario Alberto Domínguez Magaña (†) mi mentor del tiempo que me enseñase realmente la aplicación de la disciplina en mi vida y al reconocido doctor Cirilo Nolasco Hipólito mi mentor de pensamiento que me enseñase a retroalimentarme de los errores usando la inteligencia y también a la Dra. Fabiola Hernández Sánchez por ser parte de esa disciplina colaborando en todo momento y a cada uno de los colaboradores en este arduo proyecto, gracias a sus humildes lecciones y por compartir tantos años de conocimientos para forjar estudiantes nobles con ganas de sobresalir, a todo el cuerpo académico existente y a todas las personas que me han acompañado a lo largo de mi trayectoria, gracias totales con profundo amor.

I. Índice

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 3 |
| 2.1. Alimento funcional..... | 3 |
| 2.2. Microorganismo probiótico..... | 4 |
| 2.3. Beneficios a la salud por el consumo de probióticos..... | 7 |
| 2.3.1. A nivel interior del tracto gastrointestinal..... | 7 |
| 2.3.2. A nivel del epitelio y mucosa intestinal..... | 7 |
| 2.4. Proceso de fermentación en alimentos | 9 |
| 2.4.1. Alimentos fermentados adicionados con probióticos..... | 10 |
| 2.4.2. Fermentación de vegetales con bacterias ácido lácticas..... | 12 |
| 2.5. Infusión aromática de plantas en Latinoamérica..... | 15 |
| 2.6. Planta utilizada en el presente estudio: Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)..... | 16 |
| 2.6.1. Descripción botánica general..... | 16 |
| 2.6.2. Composición química:..... | 16 |
| 2.6.3. Propiedades físicas y biológicas..... | 17 |
| 2.7. Cepas de bacterias probióticas utilizadas en el presente estudio..... | 17 |
| 3. Justificación | 20 |

| | |
|---|----|
| 4. Hipótesis | 21 |
| 5. Objetivo general | 21 |
| 5.1. Objetivos específicos | 21 |
| 6. Materiales y métodos | 22 |
| 6.1. Estrategia experimental..... | 22 |
| 6.2. Preparación de las infusiones | 24 |
| 6.3. Cepas de BAL empleadas | 24 |
| 6.4. Autoclavado de bebidas..... | 24 |
| 6.5. Preparación del inóculo | 25 |
| 6.6. Metodología de las fermentaciones | 25 |
| 6.7. Análisis de vida de anaquel..... | 26 |
| 6.8. Diseño de experimentos y análisis estadístico | 27 |
| 6.9. Métodos analíticos en el proceso fermentativo..... | 27 |
| 6.9.1. Cálculo de la tasa de crecimiento | 27 |
| 6.9.2. Determinación de pH | 28 |
| 6.9.3. Determinación de acidez titulable | 28 |
| 6.10. Caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de las bebidas fermentadas..... | 28 |
| 6.10.1. Mesófilos aerobios..... | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 6.10.2. Coliformes fecales | 29 |
| 6.10.3. Hongos y levaduras | 29 |
| 6.10.4. Contenido de fenoles totales | 29 |
| 6.10.5. Prueba de aceptación sensorial | 30 |
| 7. Resultados y discusiones | 32 |
| 7.1 Cuentas viables (CFU/mL) | 32 |
| 7.2 Velocidad o tasa de crecimiento promedio | 36 |
| 7.3 pH de fermentación | 36 |
| 7.4 Porcentaje de acidez titulable | 38 |
| 7.5 Análisis microbiológicos a las bebidas fermentadas | 39 |
| 7.6 Prueba de aceptación sensorial | 40 |
| 7.7 Determinación del contenido de fenoles totales | 44 |
| 7.8 Viabilidad de las bebidas fermentadas | 47 |
| 8. Conclusiones | 51 |
| 9. Perspectivas | 52 |
| 10. Bibliografía | 53 |

II. Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)..... | 16 |
| Figura 2. Extractos relajantes..... | 17 |
| Figura 3. Terpenoides..... | 17 |
| Figura 4. Flujo metodológico experimental aplicado..... | 23 |
| Figura 5. Cuentas viables de ambas cepas BAL en el primer tratamiento al 10% después de 24h de fermentación. | 33 |
| Figura 6. Cuentas viables de ambas cepas BAL en el segundo tratamiento al 15% después de 24h de fermentación. | 33 |
| Figura 7. Crecimiento observado alusivo a las cuentas viables de BAL..... | 34 |
| Figura 8. Tasa de crecimiento de cada cepa en ambos tratamientos después de 24h de fermentación. | 36 |
| Figura 9. Cinética de pH de fermentación sacarosa al 10% durante 24h de fermentación. | 37 |
| Figura 10. Cinética de pH de fermentación sacarosa al 15% durante 24h de fermentación. | 37 |
| Figura 11. Cinética de producción de ácido láctico durante la fermentación de sacarosa al 10%. | 38 |
| Figura 12. Cinética de producción de ácido láctico durante la fermentación de sacarosa al 15%. | 39 |
| Figura 13. Análisis microbiológicos de calidad sanitaria realizados..... | 40 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Fermentación secundaria generada para todas las pruebas..... | 41 |
| Figura 15. Sesión degustativa asistida por especialistas..... | 41 |
| Figura 16. Calificación en categoría de compra para la primera bebida destacada..... | 42 |
| Figura 17. Calificación en categoría de compra para la segunda bebida destacada. | 42 |
| Figura 18. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con <i>L.casei</i> <i>Shirota</i> 10%..... | 43 |
| Figura 19. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con <i>L.casei</i> <i>Shirota</i> 15%..... | 43 |
| Figura 20. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con <i>L.</i> <i>jhonsonii</i> 10%..... | 44 |
| Figura 21. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con <i>L.</i> <i>jhonsonii</i> 15%. | 44 |
| Figura 22. Curva estándar de ácido gálico | 45 |
| Figura 23. Contenido de fenoles totales presentes en las muestras A (IB), B (LJ1) y C (LJ2) cada una con diferente tonalidad azul por cada tubo de reacción (0, 5, 10, 20 y 40 µg/mL). | 46 |
| Figura 24. Cinética microbiana de la vida de anaquel de la bebida probiótica expresada como CFU/mL en un medio con sacarosa al 10%..... | 48 |
| Figura 25. Cinética microbiana de la vida de anaquel de la bebida probiótica expresada como CFU/mL en un medio con sacarosa al 15%..... | 48 |
| Figura 26. Monitoreo de la vida de anaquel mediante conteo microbiano durante 4 semanas..... | 49 |

III. Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Microorganismos usados como probióticos..... | 5 |
| Tabla 2. Clasificación de alimentos fermentados basada en la presencia de microorganismos vivos..... | 11 |
| Tabla 3. Características de las BAL utilizadas en el presente estudio..... | 18 |
| Tabla 4. Análisis realizados y metodologías de la fermentación..... | 26 |
| Tabla 5. Diseño estadístico factorial completo utilizado para cada tratamiento de jarabe | 27 |
| Tabla 6. Formato de evaluación de los parámetros sensoriales | 31 |
| Tabla 7. Comparación de cuentas viables a las 24h de fermentación de este trabajo con otras infusiones. | 34 |
| Tabla 8. Datos obtenidos de las fermentaciones con BAL de cada tratamiento respecto a otros autores. | 35 |
| Tabla 9. Análisis realizados a las bebidas después de 24 h de fermentación. | 40 |
| Tabla 10. Contenido de fenoles totales reales expresados en μg de ácido gálico por mL de muestra..... | 46 |
| Tabla 11. Viabilidad de los cultivos de BAL de ambos tratamientos almacenadas a 4 °C. . | 50 |

Resumen

Las hierbas aromáticas y medicinales han sido durante años una de las herramientas más utilizadas del ser humano en todo el mundo. Las propiedades observadas en aquellos tiempos curaban algunas patologías desconocidas que ahora en nuestro presente son bastante comunes. Existen una gran diversidad de hierbas aromáticas con propiedades terapéuticas que la ciencia ha estudiado para grandes aportes en la salud, entre ellas se encuentra la Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) la cual es reconocida con múltiples propiedades tales como: analgésica, antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, y antiséptica, muchas de estas han sido efectivas mediante el consumo de infusiones recurrentemente en la sociedad actual. Por otra parte se sabe que la fermentación ácido láctica representa una alternativa tecnológica para incrementar la calidad nutricional de los alimentos empleados como base mediante uso de BAL (bacterias ácido lácticas) probióticas que aportan efectos sinérgicos en la salud del hospedero. En el presente estudio se elaboró una bebida fermentada de una base estandarizada de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) utilizando cepas de BAL probióticas: *Lb. casei Shirota* & *Lb. jhonsonii*, con el fin de evaluar el efecto de incorporar dos niveles de jarabe de sacarosa al 10 y 15 % p/v como fuente de sustrato para su fermentación durante 24 h. En todas las bebidas se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en las variables respuesta de crecimiento consideradas (cuentas viables, tasa de crecimiento y porcentaje de acidez) de ambos tratamientos de cada cepa por lo que también se consideró su elección final bajo el panel estadístico de evaluación sensorial (tratamiento al 10%). Los datos obtenidos de cuentas viables oscilaron entre 7.35-7.51 $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$ cumpliendo la condición para ser considerado probiótico ($> 6 \text{ Log}_{10}\text{CFU/mL}$), las tasas de crecimiento (μ) oscilaron entre 0.1743 y 0.1823, el pH entre 4.15 y 4.21 y el porcentaje de acidez entre 0.2829 y 0.2863. Además la calidad sanitaria evaluada fue aceptable (ausencia de hongos, levaduras y coliformes). El contenido de fenoles totales incrementó notablemente con respecto a la infusión antes de ser fermentada. Por último, la viabilidad de las bebidas a 4 °C posterior a 4 semanas obtuvo cuentas viables entre 6 y 6.15 $\text{Log}_{10}\text{CFU/mL}$. De modo que, este trabajo demostró que la elaboración de bebidas fermentadas con una infusión a base de Manzanilla utilizando cepas de BAL probióticas es viable.

Palabras clave: *Bacteria probiótica, Lb. Jhonsonii, Lb. Casei Shirota, jarabe de sacarosa, fermentación, cuentas viables, calidad sanitaria, prueba sensorial, fenoles totales.*

1. Introducción

En la naturaleza, está perfectamente comprobado el papel ecológico de los microorganismos y la importancia que tienen estos en todos los ciclos biogeoquímicos existentes. Cualquier alimento ingerido o consumido por el hombre procede únicamente de origen vegetal o de origen animal e incluso una combinación de ambos (algunos proteicos texturizados), resulta impactante y sorprendente que dichos insumos puedan contener ciertas cargas microbiológicas (microorganismos) que interaccionen con sus componentes, biológicamente los microorganismos utilizan nuestros alimentos como fuente de nutriente-sustrato para su propio crecimiento, pero esto a su vez trae consecuencias irreversibles que naturalmente ocasionan la alteración de las características sensoriales y de apariencia de muchos de los alimentos en el mercado.

La salud y la alimentación son dos aspectos íntimamente proporcionales y cuyo carácter son de importancia para la mayoría de los seres humanos, en este sentido se reporta que Latinoamérica es considerada una de las regiones del continente americano con mayores problemas metabólicos en el mundo, debido a esto la población se ha posicionado según los expertos en nutrición como objeto de estudios experimentales para demostrar la relación que existe entre la dieta y alimentación de la población con patologías más frecuentes como el cáncer, la diabetes, deficiencias motrices y alteraciones óseas crónico degenerativas, razones frecuentes las cuales son sumadas a la lista negra de las principales defunciones en el país. Hoy en día la ciencia en la industria alimentaria en conjunto con otras disciplinas como la biotecnología, biología molecular, microbiología alimentaria y nutrición buscan proporcionar y facilitar a la población de ciertos bienes o servicios combinados en ciertos productos del mercado. El objetivo o propósito alimentario es el mismo en todos los casos, otorgar los atributos previamente integrados durante el proceso de formulación del producto, para posteriormente al ser ingerido por el consumidor, este le pueda contribuir en algunos procesos fisiológicos y al mismo tiempo enriquecerle de nutrientes.

Actualmente en el continente americano y el resto del mundo existe una amplia gama de productos funcionales (probióticos p, ej.) generados por la industria de los alimentos, no obstante, casi todos o la mayoría de ellos están elaborados con base láctea y no satisfacen la demanda de ciertas comunidades poblacionales, tal es el caso de los intolerantes a la lactosa o a proteínas derivadas de la leche, a personas vegetarianas o a los que simplemente no consumen nada de origen lácteo. Por tal motivo se busca formular, producir y ofrecer bebidas fermentadas no convencionales hechas a base de infusiones aromáticas adicionado con bacterias probióticas o bacterias ácido lácticas (BAL, en inglés es LAB) con propiedades medicinales atribuidas. El objetivo esencial es el de brindar a la población un producto funcional dirigido hacia la salud del consumidor, siempre y cuando se administre en las cantidades adecuadas. El proceso fermentativo actúa como método de conservación y transformación de las características sensoriales de los alimentos dando como resultado diferentes sabores, aromas y texturas, además de ser versátil y accesible se sabe que se pueden incrementar las propiedades y valores nutricionales de los alimentos que pasen por este proceso de transición. En el presente estudio se realizaron fermentaciones en medio líquido utilizando una base vegetal estandarizada con bacterias ácido lácticas probióticas. La finalidad fue elaborar bebidas fermentadas no convencionales con un posible potencial de consumo sugerido en la alimentación complementaria del consumidor sin alterar su cuadro o esquema alimenticio (siempre y cuando se dosifique en las cantidades adecuadas) y por ende aproveche todos los beneficios y propiedades contenidas en el producto tomando en consideración su condición o hábitos de salud.

2. Antecedentes

2.1. Alimento funcional

A través de los años la ciencia ha ido evolucionando según las necesidades del ser humano y proporcionalmente han surgido nuevos conceptos e ideas a los que regularmente han ido respondiendo y actualizando sus definiciones, la rama encargada del área alimenticia recientemente ha desarrollado, gracias a la tecnología de alimentos, los llamados alimentos funcionales. Demasiadas definiciones de alimento funcional existen en todo el mundo, todas asignadas por la comunidad científica, pero la mayoría coincide en una sola idea central según los atributos que este posee, concretamente es definido como todo alimento que, además de su valor nutritivo, contiene componentes biológicamente activos que aportan algún efecto añadido y beneficioso para la salud y a su vez reducen el riesgo de contraer o desarrollar ciertas patologías o enfermedades (*Fuentes-Berrio et al., 2015*). En términos más simples, quiere decir que podemos llamar a un alimento funcional a todos aquellos a los que se les ha adicionado, incrementado o añadido en su contenido (generalmente sustancias de interés biotecnológico) o eliminado algunos componentes (que usualmente son dañinos), a los que se ha modificado su naturaleza (modificaciones a nivel genético) o biodisponibilidad de alguno de sus componentes, o cualquiera de las combinaciones anteriores. Cabe mencionar que también pueden ser considerados aquellos alimentos que son de origen natural y que por sí solos proveen de ciertos beneficios al consumirlos (*Topolska et al., 2021*). Las características más puntuales que debe cumplir un alimento para ser considerado funcional son las siguientes:

- Formar parte del esquema de consumo diario o cotidiano.
- No perjudicar ni alterar el estado de salud u homeostasis del consumidor.
- Otorgar propiedades nutritivas y beneficiosas para el organismo.
- Disminuir o prevenir el riesgo de patologías u enfermedades, además de mejorar o enriquecer el estado de salud del individuo.
- Deben poder demostrar y comprobar sus efectos beneficiosos dentro de las cantidades (el secreto está en la dosis) que normalmente se consumen en la dieta (*Topolska et al., 2021*).

Hoy en día, se destacan diversas razones las cuales implican y conllevan a la producción de este tipo particular de alimentos las cuales son:

- Interés creciente de la relación alimentaria con la salud.
- Senescencia progresiva de la población y desabasto.
- Aumento de patologías o enfermedades crónicas reflejadas en los índices de muerte.
- Preocupación por la sanidad alimenticia.
- Mayor relevancia del etiquetado nutricional.
- Interés por la prevención de enfermedades de origen alimentario (ETA's).
- Surgimiento de nuevas tecnologías alimentarias (*Fuentes-Berrio et al., 2015*).

Una vez avalados estos lineamientos es posible hacer escalamiento para el desarrollo nuevos procesos en la industria alimentaria.

2.2. Microorganismo probiótico

De acuerdo al concepto de funcionalidad, se puede visualizar que en el mercado existen alimentos selectos, seguros, frecuentes y relativamente accesibles para algunas comunidades, más precisamente son aquellos preparados con base probiótica, generalmente son productos derivados de lácteos y por su gran valor nutricional se encuentran en la cima del mercado internacional, de hecho, se sabe que los probióticos en general son microorganismos vivos que sobreviven al paso por el tracto gastrointestinal y que ejercen efectos beneficiosos sobre la salud de quien los consume, especialmente, por su capacidad de contribuir a mejorar el equilibrio microbiano intestinal. Éstos compiten por los nutrientes y por los sitios de adhesión, e inhiben la proliferación de microorganismos patógenos. También estas especies pueden sintetizar ácidos orgánicos que reducen el pH intestinal y retardan el crecimiento de bacterias patógenas sensibles al pH (*Markowiak & Śliżewska, 2017*).

Otro punto importante sobre estos productos es que contienen sustancias bioactivas tales como péptidos, flavonoides, isoflavonas y algunos antioxidantes que son de un alto perfil energético. Un alimento que contenga microorganismos probióticos será capaz de proteger al individuo de diferentes maneras, ya sea, compitiendo con microorganismos dañinos por espacio físico y

nutrientes, produciendo sustancias antibióticas como las bacteriocinas activas frente a patógenos, estimulando el sistema inmune del intestino y acidificando el medio intestinal, lo cual es perjudicial para el acrecentamiento de patógenos (Badui, 2006). Los alimentos y productos que los contienen deben tener al menos 1×10^6 UFC/mL de bacterias, manteniéndose en toda la vida útil del producto (Siuta-Cruce, 2001). Gran parte de estos microorganismos probióticos son del grupo de las BAL, las cuales conforman un grupo prolongado de microorganismos anaerobios facultativos, aerotolerantes Gram positivos, no forman esporas, catalasa y oxidasa negativas, bacilos alargados o de tipo esférico (Badui, 2006). De hecho, la característica más importante de estos microorganismos y por la cual son tan populares en el sector alimentario es por la síntesis de ATP a partir de procesos fermentativos dando como resultado ácido láctico, una sustancia más de interés biotecnológico. En la *Tabla 1* se muestran los microorganismos probióticos usados más importantes en la industria de los alimentos.

Tabla 1. Microorganismos usados como probióticos.

| | |
|--|-------------------------------------|
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Bifidobacterium bifidum</i> |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | <i>Bifidobacterium infantis</i> |
| <i>Lactobacillus casei</i> | <i>Bifidobacterium adolescentes</i> |
| <i>Lactobacillus reuteri</i> | <i>Bifidobacterium longum</i> |
| <i>Saccharomyces boulardii</i> | <i>Bifidobacterium breve</i> |
| <i>Lactococcus lactis</i> spp. <i>Lactis</i> | <i>Streptococcus salivarius</i> |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | <i>Enterococcus faecium</i> |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | <i>Lactobacillus jhonsonii</i> |

Fuente: Ramírez et al., 2011

A partir de estos procesos se obtienen las bebidas no convencionales de carácter funcional, las cuales se describen como bebidas sin alcohol, fortificadas con un ingrediente como hierbas, minerales, vitaminas, azúcares o vegetales crudos adicionales o probióticos que brindan cualidades de salud específicas más allá de las que se encuentran en otras fuentes de alimentos generales. Las BAL han sido generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en

inglés) ya que desempeñan un papel fundamental en la producción de bebidas y alimentos fermentados. En consecuencia, la fermentación ácido láctica por acción de BAL (LAF, por sus siglas en inglés) es un método natural para obtener compuestos de interés biológico como materias primas que son beneficiosas para la salud del consumidor (*Ajibola et al., 2020*). Cabe mencionar su capacidad bacteriana de preservar los alimentos, además confieren nuevas texturas, sabores, aromas a los alimentos fermentados y permiten el desarrollo de nuevos productos. Para que un microorganismo pueda ser calificado como probiótico seguro debe cumplir una serie de requisitos, entre los que cabe destacar:

- Estar total y correctamente identificado.
- No poseer factores de virulencia y/o capacidad de producir metabolitos dañinos para el hospedero, requisito que disminuye considerablemente los posibles candidatos a ejercer este rol.
- En la práctica, los probióticos acreditados como tales proceden únicamente de los fermentos utilizados en la fermentación de alimentos, fundamentalmente son los lactobacilos y bifidobacterias (no son incluidas cepas patógenas dentro de la especie a la que pertenecen).
- Demostrar científicamente, mediante ensayos clínicos en humanos, los efectos beneficiosos en la salud del hospedero y la seguridad del microorganismo que los produce, más allá de los beneficios inherentes de la nutrición o plan básico alimenticio.
- Mostrar tolerancia a las condiciones (capacidad de supervivencia) del entorno donde ejercen su acción y mantenerse viables y funcionalmente activos (expandirse o colonizar) en el tracto gastrointestinal.
- Ingerir la cantidad recomendada para poder ejercer el efecto deseado.
- Los microorganismos incorporados deben ser viables en los productos a los que se incorporan (*Alkhatib et al., 2017*).

2.3. Beneficios a la salud por el consumo de probióticos

Verificar o comprobar científicamente el mecanismo de acción de los probióticos es fundamental para que puedan ser acreditados como tales. En función de la cepa seleccionada pueden actuar en el hospedador a distintos niveles:

2.3.1. A nivel interior del tracto gastrointestinal

Se encargan de interactuar directamente con la microbiota intestinal. Primeramente, los probióticos se encargan de modular y regular su composición ya sea mediante la inhibición de microorganismos patógenos (debido a la producción de antimicrobianos como las bacteriocinas) o favorecen la presencia y diversidad de bacterias consideradas beneficiosas (simbiosis) dentro del ecosistema intestinal (*Guillot, 2018*). La modificación de la flora intestinal mediante la ingesta de probióticos es parte fundamental de varias de las funciones metabólicas que esta ejerce, entre las que se destacan: absorción de determinados nutrientes (a nivel de endomembranas), degradación de material no digerible de la dieta (o muy difícil de procesar, como la fibra insoluble), regulación del almacenamiento de energía (reservas de glucógeno), biotransformación de xenobióticos (fármacos, aditivos alimentarios, contaminantes, etc.), síntesis de vitaminas (vitamina K y algunas del complejo B) y aumento de absorción de minerales, entre otras (*Guillot, 2018*).

2.3.2. A nivel del epitelio y mucosa intestinal

Los probióticos mejoran y amplifican eficazmente la función de la barrera intestinal. Es un mecanismo de defensa que ayuda a mantener la integridad del epitelio intestinal frente a la acción de agresiones o agentes externos. Se ha reportado que también pueden prevenir la manifestación de desórdenes como la enfermedad inflamatoria crónica intestinal, celiaquía, infecciones entéricas (bacterias oportunistas y patógenas), algunas enfermedades autoinmunes (lupus), etc. La ingesta de probióticos contribuye al mantenimiento de dicha integridad, así como a prevenir los daños efectuados en la mucosa intestinal por acción de alérgenos alimentarios, microorganismos patógenos, citoquinas proinflamatorias, etc., además de reparar y normalizar la permeabilidad intestinal e inflamación (*Markowiak & Ślizewska, 2017*).

Contribuyen metabólicamente en los procesos de digestión. Intervienen en la metabolización de la lactosa (actividad β -galactosidasa), de proteínas y lípidos, en la síntesis de aminoácidos y vitaminas, procesos fermentativos de glúcidos, en la obtención de ácidos grasos de cadena corta y en el aumento para la absorción de minerales (permeabilización de la membrana) como el calcio, magnesio y hierro mediante una disminución de pH intestinal, incremento en el número de enterocitos y en la reducción del contenido de ácido fólico (*Manzano et al., 2012*).

Indirectamente conectados al sistema inmunológico de la mucosa. Las bacterias intestinales tienen una gran influencia sobre dicha función y ciertos probióticos tienen la capacidad de alterar este ecosistema intestinal (sin dañar al consumidor si se administra en las dosis adecuadas), por un lado, estimulando los mecanismos inmunitarios de la mucosa y por otro estimulando los mecanismos no inmunitarios mediante el antagonismo inhibiendo el crecimiento de probables patógenos en la mucosa o la competencia con patógenos potencialmente peligrosos (*Naissinger da Silva et al., 2021*). Concretamente los beneficios inmunológicos podrían resumirse en la activación de los macrófagos (encargados de sacar la basura coloquialmente) locales para que aumente la presentación de antígenos a los linfocitos B y así aumente la producción de inmunoglobulina A secretora local y sistémica, se modulen los perfiles de las citoquinas y se induzca la hiporrespuesta a los antígenos alimentarios (*Ramírez et al, 2011*). Los principales beneficios y propiedades otorgadas por el consumo de probióticos son los siguientes:

- Favorables en la prevención y el tratamiento de cuadros infecciosos de diarreas (rotavirus) restando directamente el consumo de antibióticos farmacológicos.
- Contribuyen a disminuir la intolerancia a la lactosa.
- Reducen notoriamente alteraciones y síntomas de la inflamación intestinal, fuertemente ligados con los daños en la función transmembranal de la mucosa intestinal.
- Disminuyen los niveles de colesterol en dos fases; primero disminuye la concentración plasmática de LDL y consecuentemente el colesterol total, permitiendo mayor pureza en plasma sanguíneo.
- Amplifican el sistema inmune: reducen la intensidad de los síntomas y previenen algunas

afecciones comunes como cuadros alérgicos, asma, dermatitis atópica (*Machado, 2020*).

2.4. Proceso de fermentación en alimentos

Esta práctica consiste en la modificación de la estructura de las materias primas como frutas, cereales, vegetales o carnes, entre otras, mediante la acción de diversos microorganismos que, a través de reacciones metabólicas, principalmente de los azúcares (sustrato principal) de estos alimentos, permiten la formación de ácidos orgánicos como: acético, láctico, butírico y propiónico, y de algunos alcoholes como el etanol, así como la liberación de algunos aminoácidos (*Frazier, 1993*). La mayoría de las fermentaciones que tienen lugar en los alimentos pueden resultar de mucha utilidad e interés alimentario para las finalidades siguientes:

- a) Producir sabores y propiedades físicas deseables que antes no tenían.
- b) Producir un alimento totalmente diferente en sus características sensoriales.
- c) Favorecer la conservación de los alimentos.

La importancia de estas finalidades es distinta en cada alimento y es difícil elegirla concretamente. Durante las últimas décadas se ha puesto en evidencia que la gran mayoría de los alimentos fermentados cuentan con una serie de propiedades fundamentales para una dieta variada y equilibrada, quizás una de las razones por las cuales su preparación y consumo se ha mantenido hasta nuestros días.

De hecho, la ciencia considera ciertas premisas importantes acerca de las fermentaciones destacando las siguientes: los microorganismos (autóctonos o añadidos intencionadamente) determinan el curso y el resultado de los procesos de fermentación y contribuyen al desarrollo de las propiedades características del alimento fermentado final, los productos alimenticios fermentados solo deben etiquetarse como “poseedores de probióticos”, cuando exista evidencia de que sus componentes microbianos vivos brindan beneficios para la salud se definirá el contenido microbiológico preciso, cuando se preparen correctamente los alimentos fermentados, las bacterias y los hongos responsables de su fabricación tendrán larga trayectoria de uso seguro (*Marco et al., 2021*).

En casi todos los casos, estos productos están fuertemente arraigados a la cultura de las regiones en las que fueron desarrollados o adaptados; en otros casos la industria de los alimentos se ha beneficiado de los avances científicos y tecnológicos, entre ellos, cerveza, vino, producción de yogurt, entre otros (*Rodarte, 2014*).

2.4.1. Alimentos fermentados adicionados con probióticos

Los estudios microbiológicos de estas bebidas y alimentos indican que contienen gran cantidad de microorganismos benéficos como las BAL, las cuales son las primeras en desarrollarse y que están presentes durante todo el proceso. Éstas son las protagonistas de la acidificación de la masa o del medio (llegan a tener un valor de pH cercano a 4), ya que el producto final del proceso fermentativo es el ácido láctico, que imparte un sabor fresco y agradable al producto. Para elaborar alimentos fermentados con probióticos es importante considerar que el alimento contenga nutrientes (de alto perfil calórico) que puedan ser utilizados como sustrato para el crecimiento del microorganismo, pero que al mismo tiempo, carezca de compuestos que puedan inhibir al probiótico (antimicrobianos fuertes) o que las cantidades de estas sustancias inhibitorias permitan el crecimiento de los microorganismos a utilizar, se ha determinado que si se consumen en grandes concentraciones que se reportan como unidades formadoras de colonias (aproximadamente 10^6 CFU/mL) tienen un efecto en la salud intestinal del consumidor (*Rodarte, 2014*).

Particularmente, los prebióticos son sustancias químicas que el cuerpo humano no puede metabolizar y que cuando llegan al intestino son consumidas por la población benéfica de microorganismos (cepas colonizadoras nativas intestinales), siendo esta población la que mantiene sana e integra la microbiota (*Naissinger da Silva et al., 2021*). Existen en el mercado alimentos fermentados que contienen probióticos o simbióticos (probióticos y prebióticos). En algunos alimentos fermentados tradicionales se han encontrado bacterias con la capacidad de subsistir en el estómago (cuyo valor de pH es muy bajo) a su llegada al intestino, donde deben sobrevivir a un valor de pH alcalino, a la actividad de algunas enzimas del intestino y, además, ser capaces de adherirse en el intestino y producir polímeros extracelulares (*Sánchez et al., 2015*).

En los productos fermentados modernos se ha logrado determinar aquel o aquellos microorganismos clave para el proceso fermentativo, por lo que es posible garantizar la inocuidad microbiológica del producto pasteurizando previamente la materia prima, para eliminar así la mayor parte de los microorganismos, y añadiendo posteriormente los microorganismos clave, previamente cultivados en el laboratorio. Esto permite además controlar las condiciones de la fermentación, como la temperatura y, eventualmente, la aireación o el pH (*Gadhouri et al., 2021*).

Es conveniente que la pasteurización de alimentos se realice por lo general a 80 °C durante 10 min para añadir posteriormente los microorganismos responsables del proceso, aquellos que se sabe van a modificar el alimento para obtener una calidad uniforme. Es importante producir el alimento en condiciones controladas, incluido el envasado posterior al proceso de fermentación, ya que se busca, en primer lugar, garantizar la inocuidad del producto, además de que las características del alimento sean homogéneas entre lote y lote; si el color es amarillo, que no existan algunos verdes; así como que el sabor, el olor y el aspecto sean los mismos (*Frazier, 1993*). La *Tabla 2* muestra una clasificación de alimentos fermentados basada en la presencia de microorganismos vivos.

Tabla 2. Clasificación de alimentos fermentados basada en la presencia de microorganismos vivos.

| <i>Fermentados</i> | | <i>No fermentados</i> |
|--------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| <u><i>Con microorganismos</i></u> | <u><i>Sin microorganismos</i></u> | |
| <i>Crema agria</i> | <i>Salchichas</i> | <i>Pan con levadura química</i> |
| <i>Yogur</i> | <i>Jamones</i> | <i>Salchicha fresca</i> |
| <i>Kéfir</i> | <i>Tocino</i> | <i>Verduras en conserva</i> |
| <i>Miso</i> | <i>Salmueras</i> | <i>Salsa de soja química</i> |
| <i>Tempeh</i> | <i>Almibares</i> | <i>Carnes para conservar</i> |
| <i>Quesos (mayormente)</i> | <i>Pasteurizados y liofilizados</i> | |
| <i>Sahuerkraut y chucrut</i> | <i>Salsa de soja y ostión</i> | |
| <i>Carnes frías curadas</i> | <i>Cereales y legumbres</i> | |
| <i>Boza, bushera, otros cereales</i> | <i>Frutas y verduras</i> | |

| | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| <i>Kombucha</i> | <i>Carnes frescas</i> |
| <i>Cervezas, vinos, etc.</i> | <i>Infusiones</i> |
| <i>Granos de café y chocolate</i> | <i>Materia prima</i> |
| <i>Ensilados</i> | |

Fuente: (Marco et al., 2021).

2.4.2. Fermentación de vegetales con bacterias ácido lácticas

Gracias a los avances de la ciencia moderna, microbiología alimentaria y por estudios de probióticos antes mencionados, las BAL han sido ampliamente aceptadas como seguras o generally recognized as safe (GRAS, por sus siglas en inglés) y han desempeñado un papel fundamental en la generación de bebidas fermentadas y la producción de alimentos probióticos (Kantachote et al., 2017). En un estudio realizado por Cruz-Uriarte. (2017), se probó la viabilidad de 3 infusiones vegetales (yerbabuena, limón y citronela) como base para la elaboración de bebidas fermentadas utilizando 3 cepas de BAL (*Lb. Jhonsonii*, *Lb. Casei Shirota* & *Lb. Plantarum*) probióticas diferentes, se evaluó el efecto de incorporar dos niveles de jarabe simple (10 y 15 % V/V) como sustrato sobre cuentas viables después de 48 h de fermentación a 30°C y no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en las variables consideradas por lo que fue elegido el 10% como nivel de incorporación. Las cuentas viables obtenidas oscilaron entre 7-12.8 Log₁₀ CFU/mL, tasas de crecimiento (μ) entre 0.27 y 5.82, el pH entre 3.1-4.2, % acidez titulable entre 0.42 y 0.72%, ausencia de hongos-levaduras y de coliformes totales, además de ser microbiológicamente estable en condiciones de almacenamiento durante 4 semanas a 4°C. Otro estudio realizado por Ajibola et al. (2020), generaron alimentos fermentados de origen vegetal utilizando cultivos microbianos específicos como las BAL (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) y cepas de levadura (*Saccharomyces*) para la mejora de los valores nutricionales y farmacéuticos de los alimentos. La idea central parte de las bebidas a base de frutos o plantas medicinales las cuales tienen aplicación ancestral en la medicina tradicional para tratar varias enfermedades o patologías, el conocimiento actual sobre las bebidas fermentadas de este tipo es bastante escaso, especialmente la fermentación con bacterias probióticas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ajibola et al., 2020). Otros experimentos han utilizado cultivos mixtos de

levaduras y BAL para producir bebidas probióticas de bajo costo utilizando agua de coco (medio líquido propuesto también por *Ajibola et al., 2020*). No obstante, algunas de estas bacterias probióticas pueden producir ciertas toxinas durante los procesos metabólicos, lo que puede descartar su uso y aumentar las probabilidades de riesgo para los consumidores.

En el experimento realizado anteriormente, el microorganismo utilizado para la fermentación fue *L. lactis* IO-1 (JCM 7638). El cultivo madre de la cepa IO-1 lo almacenaron a -40 °C en 2 mL de viales que comprendían glicerol al 30% (v/v). *L. lactis*, cepa IO-1 había sido aislada previamente por Chinachoti et al. (1998) y sus posibles propiedades probióticas fueron reportadas por Kato et al. (2012). La cepa IO-1 (JCM7638) fue subcultivada tres veces para obtener un cultivo celular activo. Para la preparación del inóculo formularon el caldo (medio de cultivo) artificial (que comprendía 20 g/L de glucosa y 5 g/L de extracto de levadura) y fue incubado a 37 °C durante 18 h. Una vez activa la bacteria fermentaron agua de coco de 25 frutos con pH inicial de 4.78, 41.12 g/L de azúcares totales y 6.7 g/L de sólidos totales. Para preparar el medio de CW (coconut water), los sólidos suspendidos los prefiltraron con un filtro de polisulfona de 0.8 µm. El pH de las muestras lo ajustaron a 6.7 con NaOH 6 M para lograr el pH óptimo para el crecimiento de *L. lactis* en el medio preparado. La fermentación la realizaron por triplicado a 30 °C durante 48 h y realizaron muestreos cada 24 h para comprobar las propiedades requeridas como: recuento de células viables, pH, acidez total, etc.

Sharma & Mishra. (2013), evaluaron un jugo de tres vegetales, calabaza amarga (*Momordica charantia*), calabaza de botella (*Lagenaria siceraria*) y zanahoria (*Daucus carota*) en una proporción de 1:1:1 de cada vegetal) para ser usado como sustrato en fermentaciones con tres cepas de bacterias probióticas: *Lactobacillus acidophilus* NCDC 11, *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 y *Pediococcus pentosaceus* MTCC 2819. En sus resultados reportaron conteos de células viables de 1×10^7 CFU/mL para las cepas *L. acidophilus* y *P. pentosaceus* y de 1×10^8 CFU/mL para *L. plantarum*. La temperatura fue de 30°C y obtuvieron mayor conteo de bacterias a las 72 h de fermentación. Realizaron estudios de vida de anaquel obteniendo cuentas viables a las 4 semanas de refrigeración a 4°C: 1×10^7 CFU/mL para *L. plantarum*, 1×10^5 CFU/mL para *L. acidophilus* y 1×10^4 CFU/mL para *P. pentosaceus*.

En otro estudio reportado por Salamanca et al. (2010), elaboraron un cremolácteo funcional (por fermentaciones lácticas) de alto valor biológico a partir de pulpa de Borojó (*Borojoa patinoi*) utilizando miel como edulcorante y soportados en una base láctea de yogurt, donde estimaron las propiedades fisicoquímicas de las muestras de pulpa de Borojó, miel y base de yogurt. Adicionalmente realizaron valoraciones polínicas y evaluaciones microbiológicas para mesófilos aerobios, enterobacterias, mohos y levaduras, así como pruebas sensoriales cuantitativas descriptivas en cada uno de los productos y formulaciones de las mezclas estudiadas usando metodologías de análisis cuantitativo descriptivo, QDA (Armstrong, 1999). La composición de la pulpa la determinaron mediante análisis proximal y determinaciones específicas siguiendo metodología en el manual de métodos analíticos para alimentos de la AOAC (Vinson et al., 1998). Además, evaluaron 16 formulaciones distintas en el rango 5-15% de pulpa; 70-82.5 de yogurt y 5 a 15% p/p de miel. Por último los análisis fitoquímicos que realizaron fueron pH, acidez titulable, conductividad, sólidos solubles totales y °Brix, determinados de acuerdo a metodologías por AOAC. (2000), además de pruebas sensoriales a través de una escala hedónica para cada una de las formulaciones de la base láctea y la pulpa de borojó. En un tercer estudio realizado por Castro-Carranza et al. (2020), elaboraron una bebida funcional a base de pitahaya (*Hylocereus undatus*), extractos de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y albahaca (*Ocimum tenuiflorum*). Siendo los extractos obtenidos por medio de lixiviación y posteriormente realizando tamizaje fitoquímico, asimismo determinaron la actividad antioxidante por ensayos de difenil picrilo hidrazilo (DPPH) y radical ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) (de acuerdo a la metodología de Haddouchi et al., 2014) y evaluaron el contenido de compuestos fenólicos mediante el método Folin-Ciocalteu adaptado por Brighente et al. (2007). Finalmente a una bebida a base de *H. undatus*, le adicionaron diferentes porcentajes de extractos de las dos especies vegetales, y evaluaron el contenido de compuestos fenólicos. Como resultado obtenido afirmaron que ambos extractos tuvieron un contenido fenólico y capacidad antioxidante notablemente alto, lo que hace a la bebida una fuente prometedora a las industrias farmacéuticas, alimentarias y con efectos protectores sobre la salud humana.

2.5. Infusión aromática de plantas en Latinoamérica

Las plantas aromáticas desempeñan un papel importante (algunas por los metabolitos contenidos) en la mayoría de los países de América Latina, tanto por su valor folclórico y gastronómico, como por sus aportaciones en la económica regional y en la medicina tradicional. En México se han reportado alrededor de 3,100 especies de plantas medicinales, con exportaciones estimadas de 2,544 toneladas anuales valoradas en 3.3 millones de dólares (*Ocampo, 2002*). En particular, la importancia de la comercialización de plantas medicinales aromáticas radica en la amplia variedad de usos que pueden brindar al consumidor, sobre todo, cuando su destino final corresponde a la industria homeopática, de fitoterapia y/o de fitofármacos (*Leos-Malagon et al., 2020*). Las plantas aromáticas o medicinales nos brindan innumerables cualidades a la hora de preparar una infusión. Ellas deleitan a nuestro paladar con un agradable aroma y sabor, contribuyendo al buen funcionamiento del organismo. Estas plantas contienen principios activos (fitoquímicos), que varían en función a la especie y al momento de maduración de estas. Muchos de estos compuestos actúan como antioxidantes protegiendo a nuestro cuerpo (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, etc.) del daño oxidativo, el cual afecta o mata las células del organismo (*Ćwielqg-Drabek et al., 2020*). Pero, para obtener dichos compuestos o metabolitos de interés se deben realizar ciertas técnicas de extracción que resultan ser muy tardadas o costosas, es por eso que desde épocas ancestrales se ha utilizado el proceso más simple que existe en la ciencia, el calentamiento en un recipiente con fase líquida (agua generalmente) para generar una infusión aromática con propiedades atribuidas específicas según el tipo de planta. En términos simples se define como una infusión al producto o bebida obtenida de las partes blandas y secas de hojas, flores o frutos de diversas hierbas aromáticas, a las cuales se les vierte agua caliente y se las deja reposar, en un recipiente tapado, durante 5 min. No debe confundirse con un extracto (sea medicinal o no) aunque la finalidad sea la misma (extraer una fracción de materia prima) a menudo se usan disolventes comunes como el agua o el etanol para realizar constantes lavados a la biomasa, algunos de estos extractos suelen aprovecharse en forma de polvo o tintes.

2.6. Planta utilizada en el presente estudio: Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

Las posibilidades de utilizar plantas como base vegetal para este estudio son muy amplias, sin embargo, se ha elegido una planta cuyo criterio de selección fueron la disponibilidad en el mercado, el potencial de la planta como uso medicinal y la existencia de presentaciones de la planta en sobres para infusión (**Figura 1**).

Nombres comunes: manzanilla alemana o manzanilla romana.

Clasificación botánica: familia *Asteraceae*.

Lugar de origen: Países bajos, Alemania, Roma y Europa Occidental (Srivastava et al., 2010).



Figura 1. Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

2.6.1. Descripción botánica general

Planta herbácea anual de hojas filiformes. Hierba aromática con inflorescencia en capítulo (cabecita), de flósculos amarillos y lígulas blancas. Crece en todos los climas y terrenos y sus propiedades medicinales son conocidas y usadas en todo el mundo. Crece hasta los 60 cm de altura, con tallos erectos y hojas divididas con lóbulos dentados. Crece en todo tipo de terreno bien drenado, de preferencia a pleno sol. Las flores son más usadas en medicina y se recolectan desde la primavera hasta entrada del verano (Pérez-Loaiza, 2013).

2.6.2. Composición química:

Es rica en aceites volátiles caracterizados por su olor, apariencia aceitosa y sus compuestos tienen la facilidad de volatilizarse a temperatura ambiente. Químicamente, contiene más de 120 tipos de ingredientes activos medicinales, incluidos 56 tipos de ácidos orgánicos, 36 tipos de flavonoides, 28 tipos de terpenoides (los monoterpenos y sesquiterpenos), cumarinas,

hidrocarburos y sus derivados oxigenados, así como algunos compuestos aromáticos. Entre los compuestos más importantes se encuentran: quercetina, ramnosa, xilosa, cineol, limoneno, azuleno, ocimeno, elemeno, pineno, absintol, alfa bisabolol, poliacetileno, isobuteno, ácidos (caféico, tánico, clorogénico, galacturónico, palmítico, ascórbico, linoleico, oleico, esteárico y capril glicólico), umbelliferona, germacreno, camazuleno, farneseno, cariofileno, terpineol, patuletina, marigolina, apigenina, herniarina, luteolina, colina, ligeras cantidades de carotenos, matricarina y alcohol sesquiterpético (Wu et al., 2022).

2.6.3. Propiedades físicas y biológicas

Los terpenoides, entre ellos los monoterpenoides y los sesquiterpenoides, son los encargados de conferirle el olor característico a los aceites esenciales (Figura 2 y Figura 3) y en la mayoría de los casos son los responsables de las actividades biológicas, las cuales están relacionadas con la actividad antioxidante. Tienen acciones farmacológicas bien avaladas, entre ellas antiinflamatorias (debidas al camazuelo, flavonoides), como antiulceroso gástrico (bisabolol), antialérgico (proazulenos), antiséptico bactericida frente a Gram (+), antifúngico, sedante del SNC, analgésico y antineurálgico, antiespasmódico, antidiarreico, carminativo en el sistema digestivo (AE) (Vara-Delgado et al., 2019).



Figura 2. Extractos relajantes

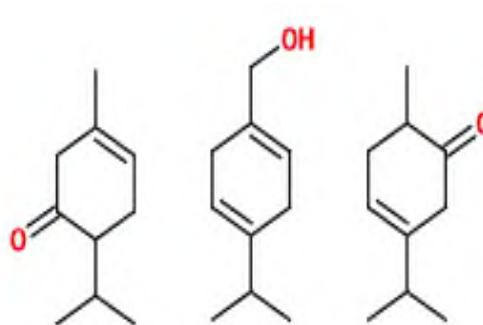




Figura 3. Terpenoides



2.7. Cepas de bacterias probióticas utilizadas en el presente estudio

Para el presente experimento se emplearon las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) de carácter probiótico: *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus jhonsonii*. Estas son las cepas más

comúnmente usadas en la industria de los alimentos por su importante papel en los procesos de fermentación, generación y producción de ácido láctico, todo esto avalado y certificado por grandes organizaciones especializadas en sanidad e inocuidad como la FAO. Hoy en día estas bacterias son el pilar central y la base para la elaboración de muchos de los productos funcionales en el mercado internacional (Domínguez-Magaña, 2006). En la *Tabla 3* se muestran y destacan las características de cada cepa bacteriana.

Tabla 3. Características de las BAL utilizadas en el presente estudio.

| | | |
|-------------------------------|--|--|
| Propiedad |  <i>L. casei Shirota</i> |  <i>L. jhonsonii</i> |
| Origen | Humano | Humano |
| Seguridad | Verificada | Verificada |
| Estabilidad en sales biliares | Resistente | Resistente |
| Estabilidad en medio ácido | Buena | Buena |
| Colonización | Si | Si |
| Produce bacteriocinas | No | Si |
| Adherencia en mucosa | Si | Si |
| Características generales | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Contribuye a la reducción de actividades enzimáticas fecales con efectos positivos en la prevención de cáncer de colon. ▪ Facilita la producción de endulzantes bajos en calorías. ▪ Facilita la producción de vitaminas del complejo B, folato, riboflavina y vitamina B12, etc. ▪ Reguladora de microbiota intestinal y absorbente de | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Posee rápida adherencia en células intestinales en humanos. ▪ Amplifica el sistema inmunológico. ▪ Reguladora de carga bacteriana de la mucosa intestinal. ▪ Contribuye a la formación de olor y sabor. ▪ Dependiente del sistema proteolítico al degradar parcialmente caseínas y generar aminoácidos libres. |

| | | |
|--|---|--|
| | endotoxinas de otras bacterias u hongos. | |
| Forma de comercialización (productos en el mercado). | <p>Leche fermentada Yakult o Sofult</p>  | <p>Leche fermentada LC1 Nestlé</p>  |

Fuente: *Salminen et al., (1996)*

3. Justificación

Los alimentos funcionales (entre estos los probióticos) son un conjunto importante de productos generados gracias a la industria alimentaria, dado que está científicamente comprobado que estos aportan beneficios al ser ingeridos. No obstante, estos productos probióticos se encuentran disponibles en el mercado casi exclusivamente a base de lácteos. Hace unos años en Colombia elaboraron una bebida fermentada de alto valor biológico a base del fruto del árbol de borrojó (*Salamanca et al., 2010*). Gracias a estos antecedentes se buscó incursionar y elaborar un probiótico no-lácteo expandiendo el inventario de alimentos funcionales, desarrollando una bebida a partir de una infusión estandarizada de una planta medicinal y fermentada con probióticos con el propósito de innovar y que estas a su vez sean agradables en características sensoriales como sabor y textura, proporcionando un impacto positivo y benéfico en el mantenimiento de la salud o prevención de enfermedades, de esta forma podremos enfocar el producto hacia consumidores intolerantes a la lactosa, vegetarianos o simplemente a aquella comunidad que no tiene preferencias hacia los lácteos o sus derivados.

4. Hipótesis

La manzanilla (*Matricaria chamomilla*) puede ser viable como infusión base para la elaboración de bebidas fermentadas con BAL probióticas.

5. Objetivo general

Elaborar una bebida fermentada no convencional a partir de una infusión estandarizada de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) como base e incorporando concentraciones de jarabe simple como sustrato para las cepas bacterianas ácido lácticas probióticas; *Lactobacillus jhansonii* y *Lactobacillus casei Shirota*.

5.1. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la adición de jarabe de sacarosa y BAL probióticas sobre parámetros de fermentación (cuentas viables, velocidad de crecimiento, acidez total titulable) con la infusión de base estandarizada.
- Determinar la calidad sanitaria al producto final mediante análisis microbiológicos: Mesófilos aerobios, hongos, levaduras, coliformes totales y fecales.
- Determinar la calidad y estabilidad del producto fermentado durante 4 semanas en refrigeración a 4 °C, con respecto a la viabilidad de los microorganismos probióticos presentes.
- Determinar el contenido de fenoles totales del producto final por métodos colorimétricos estandarizados.

6. Materiales y métodos

6.1. Estrategia experimental

Según la metodología propuesta por Cruz-Urriarte. (2017), y cuyos procesos fermentativos se realizaron utilizando cepas de BAL con propiedades probióticas comprobadas: *L. jhonsonii*, *L. casei Shirota* y *L. plantarum*. Para el presente experimento se utilizó como base de la bebida una infusión estandarizada (considerando la recomendación de uso del fabricante: 1 sobre con 1.2 g de contenido por cada 250 mL de solución) de manzanilla común (*Matricaria chamomilla*), dos niveles de concentración de jarabe de sacarosa al 10 y 15% p/v. La sacarosa fue azúcar de mesa de la marca comercial bueno. Se utilizaron dos de las cepas de BAL (*L. jhonsonii* & *L. casei Shirota*). Para poder comenzar con las fermentaciones fue necesario dividir los componentes en: preinóculo, solución de sacarosa (jarabe de sacarosa) e infusión estandarizada para después unificarlos por la disponibilidad del equipo.

Los preinóculos de BAL fueron previamente incubados durante 48 h a 40° C en caldo nutritivo. Estos se centrifugaron, lavaron y reconstituyeron pues solo el 10% fue utilizado para el volumen de operación. Tanto la solución de sacarosa como la infusión estandarizada fueron autoclavadas antes para cuidar las condiciones de asepsia de la fermentación, cuya duración fue de 24 h a 45° C y agitación a 230 rpm (repeticiones por triplicado). Los datos recopilados de la fermentación fueron cuentas viables, pH, tasa de crecimiento y porcentaje de acidez titulable. Estos se analizaron estadísticamente mediante anova de un solo factor por separado y posteriormente con un diseño factorial completo para la evaluación de la concentración de jarabe de sacarosa. Finalmente se realizaron pruebas de aceptación sensorial, evaluación vida de anaquel a 4 °C durante 4 semanas, análisis microbiológicos respectivos y la determinación del contenido de fenoles totales de las bebidas (**Figura 4**).

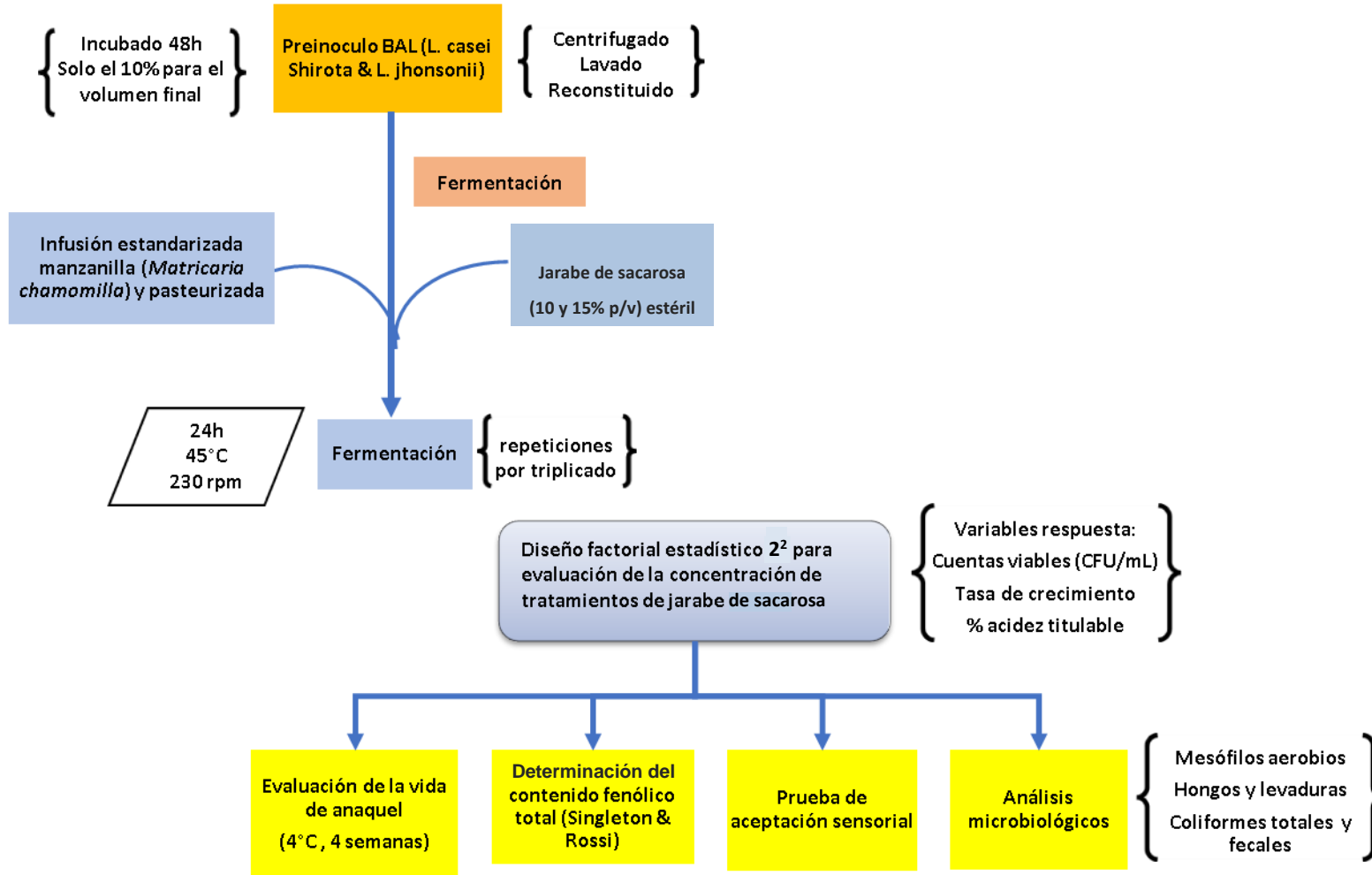


Figura 4. Flujo metodológico experimental aplicado.

6.2. Preparación de las infusiones

Se utilizaron sobres de Manzanilla marca “Bon appetite” para preparar la infusión base estandarizada de la bebida. Fueron adquiridos en un centro comercial local, verificados en las condiciones de consumo (fecha de caducidad, sin humedad, empaque sin daños) y que fueran de un solo stock para evitar la variabilidad y discrepancia en los datos finales. Las infusiones base fueron obtenidas de los sobres por un método adaptado al no disponer de tantos materiales y equipo, por lo que fue necesario en la preparación de un recipiente con suficiente capacidad (respetando criterio de igualdad) para dividir esta infusión en los demás fermentadores considerando el volumen total de la fermentación. Se realizaron autoclavados por separado: primero la solución de sacarosa (jarabe de sacarosa) durante 15 min en un recipiente con gran capacidad y posteriormente la infusión base durante 5 minutos para finalmente unificarlos (en condiciones de asepsia y flujo laminar) dentro de los fermentadores con sus respectivos inóculos reconstituidos. Tomando en cuenta una proporción de 16 sobres de Manzanilla correspondientes para 4 L de volumen de operación (instrucciones marcadas del fabricante por taza (250 mL) de agua le corresponde un sobre con 1.2 g de contenido), cuidando los tiempos de autoclavado para evitar posibles fallos no excediendo los 100 °C.

6.3. Cepas de BAL empleadas

La cepa de *L. Johnsonii* LC1 originalmente fue donada por el Dr. Humberto Hernández de la escuela nacional de ciencias biológicas del IPN y la cepa de *L. casei* Shirota originalmente fue adquirida por el Dr. Mario A. Domínguez traída directamente desde el Instituto Tecnológico de Mérida subestación de microbiología. Las cepas se encontraban en criopreservación utilizando glicerol al 20% como crioprotector.

6.4. Autoclavado de bebidas

La infusión base de Manzanilla fue autoclavada previamente a la inoculación, con el objetivo de disminuir la carga inicial microbiana por el método de autoclavado para garantizar la inocuidad de la base estandarizada además del posible deterioro de algunos de sus componentes importantes. Esta etapa se realizó previamente a la preparación de las bebidas con dos niveles de concentración de jarabe de sacarosa. Para poder efectuar este proceso se debió someter el

líquido a autoclavado a altas temperaturas (entre 60-80° C) durante un período de tiempo determinado (no mayor a 5 min). Después la infusión base tuvo que sellarse herméticamente por razones de seguridad, evitando así cualquier factor de contaminación. Para lograr esto se utilizó un recipiente o vitrolero con tapa y capacidad de 5 L para evitar repetir la operación y disminuir las probabilidades de contaminación cruzada (cubriendo con algún sellante además de la tapa para evitar entrada de patógenos) y agilizando la metodología en una sola corrida además de establecer un criterio de igualdad (el mismo aplicado para los jarabes de sacarosa) al momento de fraccionar en otros envases. (*Tortora, 2007*).

6.5. Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo con 48 h de anticipación a las mismas condiciones antes mencionadas para su crecimiento en la fermentación (45° C, 230 rpm), empleando 10 µL de la cepa correspondiente, conservada en glicerol y criopreservada en 10 mL de caldo MRS esterilizado con antelación. Posteriormente a esto, se tomó alícuotas de 1 mL de caldo nutritivo con el microorganismo crecido y se colocaron en tubos Eppendorff también previamente esterilizados.

Los tubos Eppendorff fueron sometidos a centrifugación a 10,000 rpm ($\varnothing = 20$ cm) durante 10 min a una temperatura de 10 °C. El sobrenadante fue retirado, al pellet formado se le realizó lavados agregando 1 mL de solución salina al 0.85% p/v, seguidamente mediante un vortex se reconstituyó el pellet en la solución salina. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación a las mismas condiciones. El sobrenadante fue retirado y al pellet formado, se le agregó de nuevo 1 mL de la misma solución salina. Se reconstituyó el pellet en la solución salina y de este inóculo se tomaron 500 µL por cada 50 mL de sustrato contenido en los matraces de 250 mL. Antes de inocular, se determinó el número de cuentas viables de BAL en medio agar nutritivo, mediante conteo en placa (*Vander y Splittstoesser, 1992*) y los resultados se reportaron en CFU/mL.

6.6. Metodología de las fermentaciones

Los procesos fermentativos se llevaron a cabo con cada una de las cepas de BAL, su tratamiento de jarabe de sacarosa (10 y 15%) y la infusión base estandarizada de Manzanilla (*Matricaria*

chamomilla) en un fermentador con agitación mecánica y capacidad de 5 L (utilizando un volumen de operación de 80%). Se añadió 4L de la infusión base estandarizada (previamente autoclavada) a una temperatura de 45 ± 2 °C, una agitación de 250 rpm, un pH inicial aproximado de 6.5, los procesos fermentativos constaron de aproximadamente 24 h continuas considerando esta la primera fermentación a escala mayor (principal) para el registro de datos y manipular durante el proceso.

La presentación final de la bebida fue proveniente de una segunda corrida (secundaria) a escala menor para la determinación de objetivos específicos, sellada y sin ningún tipo de manipulación externa hasta su término y teniendo por objetivo una prueba de aceptación sensorial con el fin de evaluar parámetros como olor, color, sabor y textura. Los parámetros evaluados fueron cuentas viables (CFU/mL), tasa de crecimiento (μ), pH y porcentaje de acidez titulable, cada uno de estos evaluados durante la fermentación durante por lo menos 24 h tomando lecturas cada 4 h, para las cuentas viables se usó vaciado en placa usando medio de agar método estándar. En la *Tabla 4* se indican las metodologías que se emplearon durante la fermentación.

Tabla 4. Análisis realizados y metodologías de la fermentación

| Análisis durante la cinética | Metodología |
|---|--|
| Cuantificación de células BAL (UFC/mL) | Vaciado en placa (<i>Vander y Splittstoesser, 1992</i>). |
| Cálculo de la tasa de crecimiento (μ) | Monod (<i>Shuller & Kargi, 2002</i>). |
| Medición de pH | <i>Hart & Fisher, (1991)</i> . |
| Medición del % de acidez total titulable | % acidez titulable (<i>Pereira, 1988</i>). |

Fuente: *elaboración propia*

6.7. Análisis de vida de anaquel

Al finalizar las fermentaciones (24 h a 45 °C), se almacenaron muestras de las bebidas fermentadas a una temperatura de 4° C en un periodo de 4 semanas, determinando semanalmente la viabilidad del cultivo probiótico y reportando los resultados como unidades formadoras de colonias (\log_{10} CFU/mL).

6.8. Diseño de experimentos y análisis estadístico

El diseño de experimentos se realizó en el programa MINITAB 19 y consistió en un diseño factorial completo de dimensiones 2^2 (Tabla 5), en el cual los tratamientos evaluados fueron los niveles de concentración de jarabe de sacarosa en la bebida 10 y 15 % p/v respectivamente. Cada bloque representó el tipo de cepa, aunque sin aleatorización de corridas. Las variables respuesta consideradas fueron los parámetros de crecimiento a las 24 h de fermentación: cuentas viables (CFU/mL), tasa de crecimiento (μ), % acidez titulable de cada bebida; cada tratamiento se realizó en tres réplicas.

Asimismo, los datos recopilados de las variables fueron analizadas por separado mediante análisis anova de una sola vía considerando un nivel de significancia de 0.05 para comprobar la existencia de diferencias o efecto significativo en cuestión. De igual manera se analizó estadísticamente el contenido de fenoles considerando a la absorbencia resultante como factor respuesta de las muestras y tomando en cuenta un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 5. Diseño estadístico factorial completo utilizado para cada tratamiento de jarabe

| Tipo de cepa | Niveles de concentración de jarabe simple | |
|-------------------------|---|-------|
| | 10% | 15% |
| <i>L. jhonsoonii</i> | ----- | ----- |
| <i>L. casei Shirota</i> | ----- | ----- |

Fuente: elaboración propia

6.9. Métodos analíticos en el proceso fermentativo

6.9.1. Cálculo de la tasa de crecimiento

Se realizó el cálculo de la tasa de crecimiento de las bacterias según Shuller & Kargi. (2002), mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \left[\frac{\ln \frac{X_f}{X_0}}{t_f - t_i} \right]$$

Donde:

μ = Velocidad o tasa de crecimiento (h^{-1})

Ln = Logaritmo natural

X_f = Concentración celular final expresada en CFU/mL.

X₀ = Concentración celular inicial expresada en CFU/mL.

t_i = Tiempo inicial de crecimiento

t_f = Tiempo final de crecimiento

6.9.2. Determinación de pH

Se determinó la variación del pH en el medio de cultivo durante el crecimiento de las bacterias con un potenciómetro, siguiendo el instructivo de operación del equipo. Se utilizaron 10 mL de muestra y se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 10 min.

6.9.3. Determinación de acidez titulable

Se determinaron los datos de producción de acidez durante el crecimiento de las bacterias de acuerdo al método de Pereira (1988); los resultados se expresaron como porcentaje de acidez titulable, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez titulable (\%)} = (G \cdot N \cdot \text{Meq}/V) \cdot 100$$

Donde:

G= gastos de NaOH en la titulación (mL)

N= normalidad del NaOH usado (0.1N)

Meq= miliequivalente de ácido láctico (0.060)

V= volumen de la muestra (10mL)

100= factor de porcentaje

6.10. Caracterización fisicoquímica, microbiológica y sensorial de las bebidas fermentadas

6.10.1. Mesófilos aerobios

Para realizar los análisis microbiológicos respectivos se diluyó cada producto final con una solución reguladora de fosfatos (buffer) o con agua peptonada según lo establecido en la NOM 109-SSA1-1994 y la NOM-110-SSA1-1994. Las diluciones fueron: 1:1, entre 1×10^{-1} y 1×10^{-7} , para determinar las bacterias mesófilas aerobias se utilizó el método de vaciado en placa con agar

por método estándar (BIOXON Cat. 134) reportado en la NOM-092-SSA1-1994, inoculando las diluciones entre 1×10^{-1} , y 1×10^{-5} , finalmente se incubó cada uno a 31 ± 1 °C durante 48 ± 2 h. Contabilizando las cajas que presentaron entre 25 y 250 unidades formadoras de colonias (CFU), obteniéndose el promedio de los triplicados tomando en cuenta la dilución previa de cada muestra, los resultados se reportaron de forma siguiente: [X]CFU/mL de bacterias mesófilas aerobias en placa, con agar para cuenta estándar incubadas a 48 ± 2 h a 31 ± 1 °C.

6.10.2. Coliformes fecales

Para este análisis se consideró la metodología descrita por *Hitchnins, (1992)* y siguiendo la técnica del NMP (número más probable) para coliformes totales, se transfirió un asa de cada tubo con caldo lauril triptona que haya mostrado gas a un tubo con caldo EC y se incubaron a 45 ± 1 °C aproximadamente 48 h hasta formación de gas. Si hay presencia de gas es positiva la prueba para coliformes fecales, se realizaron los cálculos correspondientes de la misma manera para los coliformes totales.

6.10.3. Hongos y levaduras

Para determinar hongos y levaduras se usaron diluciones 1:1, entre 1×10^{-1} - 1×10^{-4} ; el vaciado en placa se realizó con agar dextrosa y papa (BIOXON Cat. 119), acidificando el medio con ácido tartárico al 10% p/v y se incubaron a 25 ± 1 °C aproximadamente 5 días. Se contabilizaron las cajas que presentaron entre 10 y 150 CFU/mL, obteniéndose el promedio de los triplicados tomando en cuenta la dilución a la que se encontraba la muestra, los resultados se reportaron de forma siguiente: [X]CFU/mL de mohos y levaduras en placa en agar dextrosa y papa acidificado, incubados a 25 °C ± 1 durante 5 días. (*NOM-111-SSA1-1994; AACC, 1982*).

6.10.4. Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico ajustado de Singleton & Rossi (*Palomino et al, 2009*) con algunas modificaciones. Considerando una relación de 40mg/mL de muestra la solución control fue preparada en tubos de ensaye añadiendo 1 mL de ácido gálico, 2.5 mL de Reactivo Folin (1:2) y 2 mL de Na_2CO_3 al 7.5% después se agitó y calentó a 50 °C por 10 min para medir absorbencia a 760 nm. Luego en un tubo de reacción se

adicionaron 5 μL de cada muestra, 500 μL de agua y 1350 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (preparado previamente con 700 mL de agua destilada y añadiendo 100 g de tungstato de sodio ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 g de molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 mL de ácido fosfórico al 85% y 100 mL de ácido clorhídrico concentrado). Posteriormente se adicionaron 1100 μL de Na_2CO_3 al 7.5% y sometidos a baño maría por 15 minutos al tratarse de una reacción endotérmica, después a los 20 minutos se tomaron alícuotas de las reacciones en fotoceldas para lectura a 760 nm en el espectrofotómetro (perkin Elmer Lambda 25) y determinar absorbencia (*Kuskosky et al, 2005*). Se usaron soluciones de ácido gálico (Sigma-Aldrich®) entre 0–40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para construir la curva de calibración. Los resultados se expresaron como μg de ácido gálico por mL de muestra obtenidos de la ecuación de la recta pendiente del estándar; los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (DE).

6.10.5. Prueba de aceptación sensorial

Se reclutaron 35 estudiantes universitarios para realizar la evaluación de los atributos sensoriales tales como olor, color, sabor y textura con libertad de comentarios sobre el producto y si consideraría su compra en algún futuro de comercialización (solo por curiosidad) mediante una breve encuesta dividida en dos secciones (una para cada cepa) como se muestra en la *Tabla 6*. Se proporcionó una muestra de 15 mL a cada individuo previo de enjuagues bucales con agua antes de probar los productos. Un total de 4 productos identificados con claves diferentes fueron dadas a los participantes como sigue: (LC1: *Lb. casei Shirota* 10%, LC2: *Lb. casei Shirota* 15%, LJ1: *Lb. jhonsonii* 10%, LJ2; *Lb. jhonsonii* 15%). Una vez finalizada la recopilación de datos y lecturas del experimento, se programó una sesión de análisis sensorial del producto.

Tabla 6. Formato de evaluación de los parámetros sensoriales

Se presentan 4 muestras de bebidas a continuación (dos cepas con dos tratamientos c/u) con asignación de códigos LC1, LC2, LJ1, LJ2. Primeramente, visualice y después evalúe cada una de ellas escogiendo de izquierda a derecha, indicando el grado de satisfacción o disgusto de cada atributo por muestra de acuerdo al puntaje/categoría según la escala.

| Puntaje | Categoría para compra |
|---------|------------------------------|
| 1 | No lo compraría |
| 2 | Posiblemente no lo compraría |
| 3 | Posiblemente lo compre |
| 4 | Si lo compraría |

| Puntaje | Categoría |
|---------|----------------------------|
| 1 | Me disgusta mucho |
| 2 | Me disgusta levemente |
| 3 | No me gusta ni me disgusta |
| 4 | Me gusta levemente |
| 5 | Me gusta mucho |

| Producto | Calificación para cada atributo | | | | Veredicto de compra | Comentario |
|----------|---------------------------------|-------|-------|---------|-------------------------|------------|
| | Olor | Color | Sabor | Textura | ¿Compraría el producto? | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

7. Resultados y discusiones

7.1 Cuentas viables (CFU/mL)

Se visualizó que el efecto de la incorporación de ambos tratamientos de jarabe de sacarosa (10 y 15% p/v) en las bebidas de la infusión estandarizada de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) utilizando las cepas de BAL antes mencionadas fue significativamente diferente ($\bar{x} \pm SD$) hablando de crecimiento. No obstante no existe diferencia significativa en ambas cepas cuando se trata del mismo tratamiento, solo si se consideran ambos niveles ($p < 0.05$) ahí existen diferencias.

Para *L. casei Shirota* los valores oscilaron entre los 6.2-7.35 CFU/mL y 6.30-7.61 CFU/mL en 20h, la cepa *L. jhonsonii* en los dos tratamientos empleados tuvo mayor crecimiento registrando valores desde los 6.2-7.51 CFU/mL y 6.31-7.7 CFU/mL en 20 h. Aunque evidentemente se utilizaron las mismas cepas que Cruz-Uriarte. (2017), el crecimiento no fue tan impactante probablemente producto de la antigüedad de estas (8 años) o las condiciones de preservación (fallos en la corriente eléctrica) e inclusive la correcta manipulación para criopreservarlas pero en general la diferencia de crecimiento en las dos cepas fue ligera y ambas se desempeñaron exitosamente con un pico máximo a las 20 h encontrando la disponibilidad de material para fermentar (**Figura 5** y **Figura 6**) incluso con la presencia de compuestos antimicrobianos y bacteriostáticos propios de la base vegetal de manzanilla que pudieran interrumpir el proceso (Espinoza, 2021). En las Figuras 5 y 6, se muestran las cinéticas de crecimiento de ambas cepas con su tratamiento respectivo en la cual se aprecia una reducción en la cuenta microbiana después de las 20 h. Aunque pueden existir otros factores, es probable que la principal razón se deba a la falta de proteína en la infusión de manzanilla y no se adicionó proteína exógena. Se ha reportado la presencia de algunos aminoácidos principalmente alanina, leucina y prolina en las flores de *M. chamomilla* en cantidades muy pequeñas (Ma, Zhao, & Meng, 2015). Estas cantidades son insuficientes para mantener el crecimiento de las BAL, ya que estas tienen un requerimiento de proteínas muy exigente. Se sabe que las BAL tienen cierta preferencia por las proteínas presentes en la leche, por lo cual se tiene una gran variedad de productos lácteos fermentados por BAL (Ma, Zhao, & Meng, 2015).

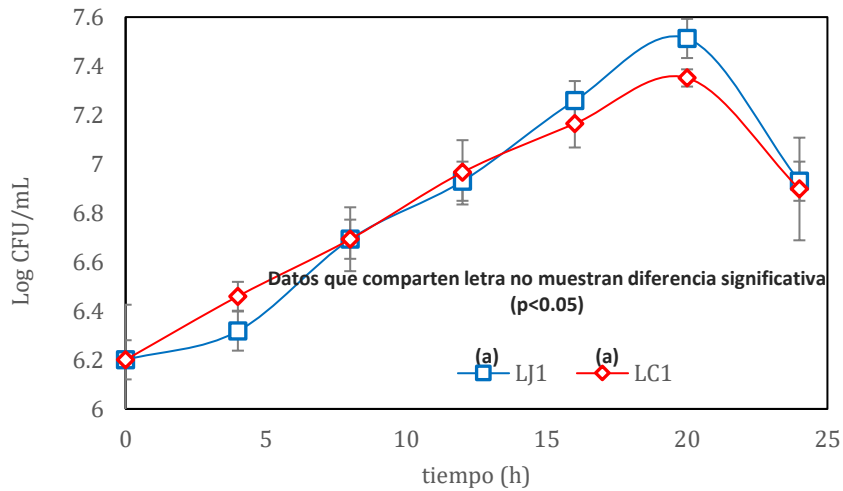


Figura 5. Cuentas viables de ambas cepas BAL en el primer tratamiento al 10% después de 24h de fermentación.

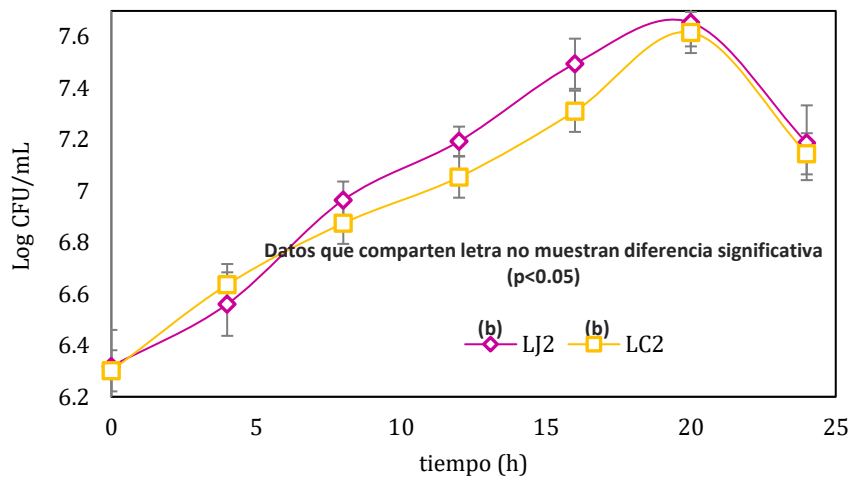


Figura 6. Cuentas viables de ambas cepas BAL en el segundo tratamiento al 15% después de 24h de fermentación.

Se muestran los crecimientos de las bacterias lácticas *L. johnsonii* y *L. casei* en placas de agar con base de sacarosa y extracto de levadura (**Figura 7**). A las 20 h de fermentación se alcanzó el máximo crecimiento de las BAL utilizadas. En la *Tabla 7*, se presentan los resultados del crecimiento promedio por cepa de BAL evaluadas durante la producción de la bebida fermentada incorporando los niveles de concentración de jarabe de sacarosa (10 y 15%), por un lado la tendencia de crecimiento entre cepa y cepa fue algo similar considerando que se trate del mismo tratamiento, ahí no habría ningún inconveniente en cuanto a su elección.

Tabla 7. Comparación de cuentas viables a las 24h de fermentación de este trabajo con otras infusiones.

| Base vegetal | Cepa | Concentración de jarabe de sacarosa Log ₁₀ (CFU/mL) | |
|---|-------------------------|--|------------------|
| | | 10% | 15% |
| Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) | <i>L. casei Shirota</i> | 6.2-7.35 ± 0.09 | 6.3-7.61 ± 0.05 |
| | <i>L. jhonsonii</i> | 6.2-7.51 ± 0.04 | 6.31-7.70 ± 0.03 |
| Hierba buena ¹ | <i>L. casei Shirota</i> | 9.3 | 9.2 |
| | <i>L. jhonsonii</i> | 9.5 | 8.92 |
| Zacate limón ¹ | <i>L. casei Shirota</i> | 10.3 | 10.1 |
| | <i>L. jhonsonii</i> | 9.8 | 8.1 |
| Hojas de limón ¹ | <i>L. casei Shirota</i> | 8.8 | 8.7 |
| | <i>L. jhonsonii</i> | 8.3 | 8.3 |

Fuente: ¹Cruz-Uriarte, (2017)

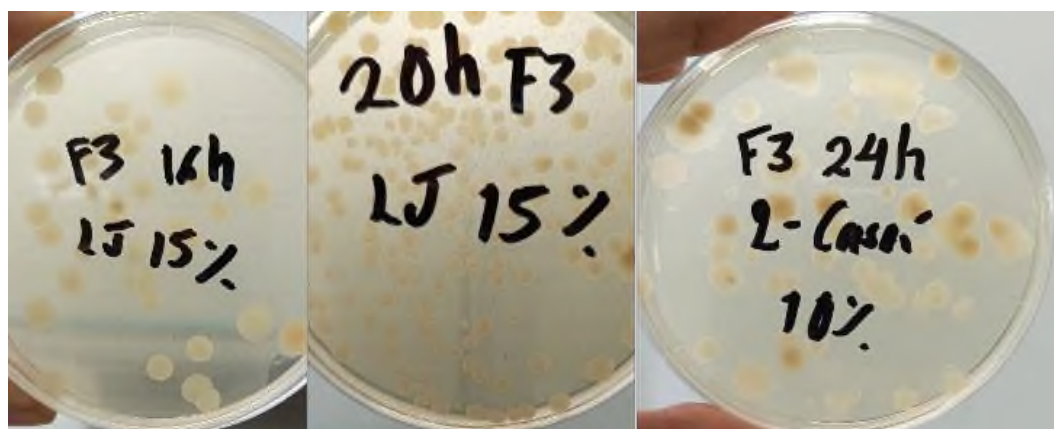


Figura 7. Crecimiento observado alusivo a las cuentas viables de BAL

Yoon et al. (2005), utilizaron el jugo de betabel como un potencial de base vegetal para la producción de bebidas probióticas con cuatro especies de bacterias ácido lácticas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*). Utilizaron una concentración inicial de 57.8 g/L de sacarosa, todos los cultivos lácticos fueron capaces de utilizar rápidamente el jugo de betabel para la síntesis celular y la producción de ácido láctico. Los autores reportaron cultivos de 1×10^9 CFU/mL después de 48 h de fermentación a 30° C (Tabla 8). Asimismo González et al. (2008), utilizaron *Aloe vera* (sábila) como base vegetal para obtener cultivos de alta concentración de células viables de dos bacterias con actividad probiótica *L.c. Shirota* (NRRL-1445) y *L. plantarum* (NCIMB 11718) reportaron crecimientos de 6.6×10^{10} y 5.7×10^9 CFU/mL para *L.c. Shirota* y *L.*

plantarum respectivamente en un tiempo de fermentación de 48 h a una temperatura de 37° C. Tantipaibulvut et al. (2008), utilizaron cepas *L. plantarum* y *L. casei* para fermentar jugo estéril de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) a una temperatura de 30° C durante 72 h, ambas cepas fueron capaces de crecer en jugo alcanzando concentraciones celulares logarítmicas de 8.47 y 8.10 CFU/mL para *L. plantarum* y *L. casei* respectivamente, encontrando que la fermentación más allá de las 24 h tuvo como resultado una disminución en los recuentos de células viables. Cabe señalar que en el presente estudio se tenía el objetivo de utilizar la cepa *L. plantarum* perteneciente a la colección de la UNPA, pero bajo ninguna condición de cultivo se logró reproducir por lo cual fue descartada de los objetivos del experimento.

Tabla 8. Datos obtenidos de las fermentaciones con BAL de cada tratamiento respecto a otros autores.

| Base vegetal [sustrato] | Cepa | Crecimiento celular Log ₁₀ CFU/mL | Tasa de crecimiento (μ) | Tiempo de fermentación (h) | T (°C) | pH* | % acidez titulable |
|---|---------------------|--|-------------------------------|----------------------------------|--------|--------|-----------------------|
| Manzanilla [10%, 15%] | <i>L. casei</i> | (7.35, 7.61) | (0.3010, | 24 | 45 | 4.21, | 0.2829, |
| | <i>Shirota</i> | | 0.3895) | | | 4.02 | 0.3022 |
| | <i>L. jhonsonii</i> | (7.51, 7.7) | (0.3132, | 24 | 45 | 4.15, | 0.2863, |
| | | | 0.3936) | | | 3.96 | 0.3146 |
| Betabel ¹ [57.8 g/L] | <i>L. casei</i> | 9.22 | 1.75 | 48 | 30 | 4.0 | 0.251 |
| | <i>Shirota</i> | | | | | | |
| | <i>L. plantarum</i> | 9.06 | 0.10 | 48 | 30 | 4.1 | 0.52 |
| Sabila ² [25%, 50%, 75%, 100%] | <i>L. casei</i> | (7.14, 7.54, | (0.148, 0.65, | 48 | 30 | 4.62 | 0.701 |
| | <i>Shirota</i> | 9.32, 10.81) | 1.54, 2.86) | | | | |
| | <i>L. plantarum</i> | (8.20, 8.43, | (1.67, 1.86, | 48 | 30 | 5.60 | 0.20 |
| | | 9.39, 9.75) | 2.69, 2.76) | | | | |
| Jamaica ³ [7%, 14%] | <i>L. casei</i> | (9.67, 9.80) | (0.165, 0.181) | 72 | 30 | (3.30, | (1.13, |
| | <i>Shirota</i> | | | | | 3.26) | 1.24) |
| | <i>L. plantarum</i> | (8.55, 8.78) | (0.049, 0.35) | 72 | 30 | (3.26, | (1.19, |
| | | | | | | 3.19) | 1.40) |

Fuente: ¹(Yoon et al., 2005) ²(González et al., 2008) ³(Tantipaibulvut et al., 2008)

7.2 Velocidad o tasa de crecimiento promedio

Haciendo énfasis en la tasa de crecimiento (μ), se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) con ambas cepas de BAL empleadas al incorporar las dos concentraciones de azúcares añadidos (**Figura 8**), sin embargo tampoco existe diferencia significativa en ambas cepas del mismo tratamiento. Las tasas de crecimiento fueron obtenidas del promedio de las réplicas con desviación estándar, la cepa *L. jhonsonii* en ambos tratamientos alcanzó valores de 0.3132 y 0.3936 h^{-1} respectivamente, en tanto la cepa *L. casei Shirota* tuvo una menor tasa registrando valores de 0.3010 y 0.3895 h^{-1} respectivamente. Es importante resaltar que ambas cepas trabajaron firmes en su crecimiento aunque tuvieron ligera diferencia quizás por el aumento de sacarosa, pero comparado con otros autores de la *Tabla 8* que tuvieron valores mayores que 1 y con medios más elevados en azúcares estas no lo hicieron nada mal.

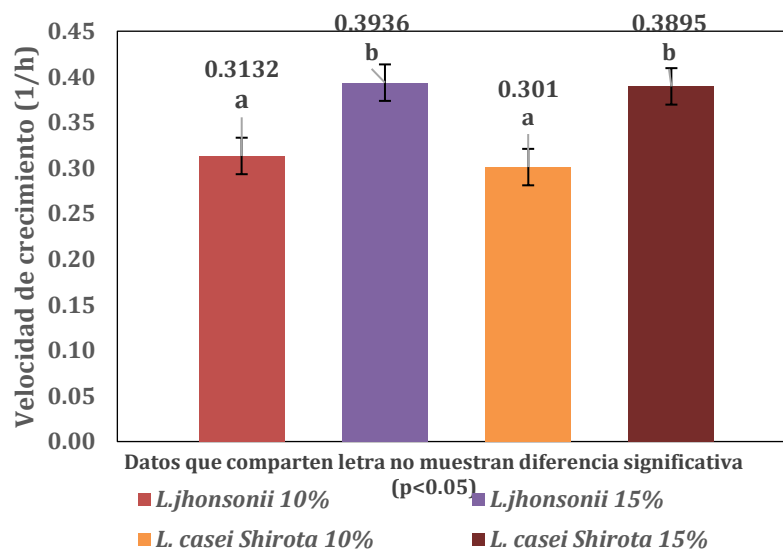


Figura 8. Tasa de crecimiento de cada cepa en ambos tratamientos después de 24h de fermentación.

7.3 pH de fermentación

Durante los procesos fermentativos se observó la disminución del pH en ambas cepas con sus respectivos tratamientos. Igualmente existe diferencia significativa ($p < 0.05$) al incorporar ambos tratamientos de las dos cepas, sin embargo las cepas no son diferentes de sí cuando es el mismo tratamiento. Por un lado, los tratamientos LJ1 y LC1 fueron relativamente parejos (acidificando) obteniendo valores bajos de 4.15 y 4.21 respectivamente, mientras los tratamientos LJ2 y LC2

alcanzaron valores de 3.96 y 4.02 (**Figura 9** y **Figura 10**) respectivamente. Esto indica probablemente una mayor producción de ácidos orgánicos como acético o láctico tomando en cuenta que se trata de BAL con características diferentes y a pesar de estas cualidades cumplieron su objetivo en poco tiempo de trabajo, además cabe resaltar un fenómeno observado en dichas cepas las cuales autoajustan el pH gradualmente a su conveniencia posteriormente a las horas de trabajo (>25h) asumiendo esto a varias causas, la primera es la cantidad de sustrato limitante en el medio, la segunda es la presencia de diversos compuestos propios de la base vegetal y la tercera es la pausa inducida por la propia cepa al no producir metabolitos por lo que pasan a un estado vegetativo de supervivencia o letargo (*Formentini, 2017*).

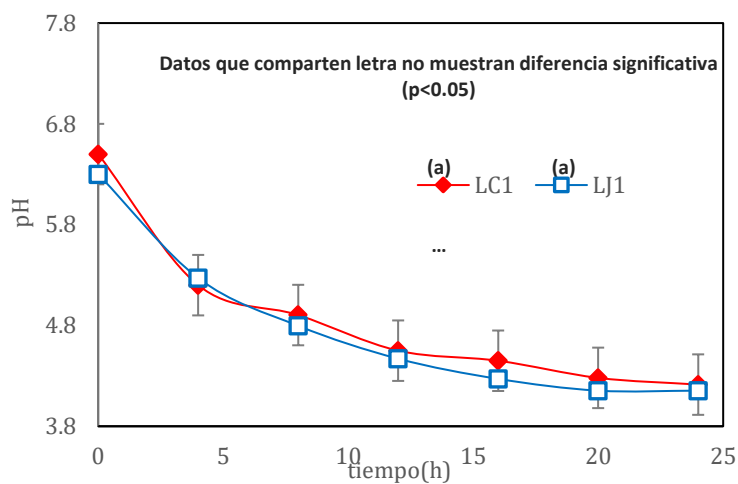


Figura 9. Cinética de pH de fermentación sacarosa al 10% durante 24h de fermentación.

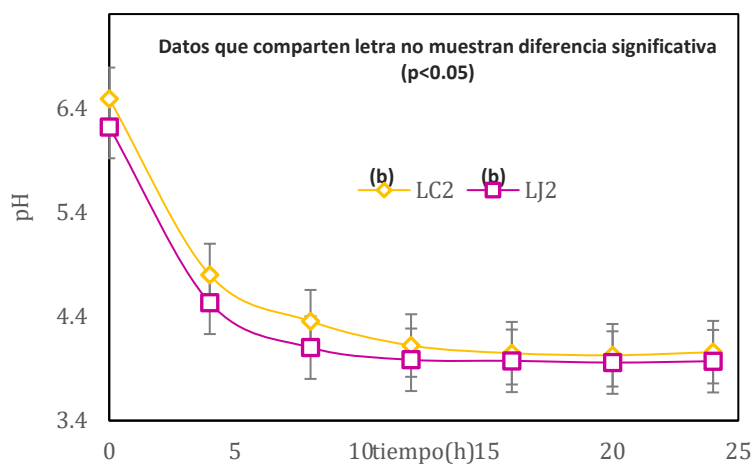


Figura 10. Cinética de pH de fermentación sacarosa al 15% durante 24h de fermentación.

7.4 Porcentaje de acidez titulable

Se encontró que también existe diferencia significativa ($p < 0.05$) al incorporar ambos tratamientos en las dos cepas, sin embargo no existe efecto significativo en las cepas cuando son del mismo tratamiento. Por un lado los tratamientos LC1 y LJ1 obtuvieron cifras de 0.2829% y 0.2863% (± 0.04) respectivamente, mientras que los tratamientos LC2 y LJ2 alcanzaron valores aproximados de 0.3022% y 0.3146% (± 0.06), cada uno expresados como porcentaje de ácido láctico (**Figura 11** y **Figura 12**). Se observó que *L. jhonsonii* produjo mayor cantidad de ácido láctico y demostró nuevamente mayor capacidad de acidificación en el medio en pocas horas de trabajo e inclusive con el ajuste inicial de pH para ambas cepas no se presenta el fenómeno de inhibición de crecimiento por producto final. Idealmente se esperaba una producción de ácido láctico similar a la de otros autores, pero cabe mencionar que las condiciones de fermentación no fueron las mismas, además de la antigüedad que poseen las cepas, la presencia de compuestos ácidos y cetonas propios de la base vegetal, las condiciones de conservación y almacenamiento, etc. La baja producción de acidez titulable en estos tratamientos en comparación de otros autores probablemente se debe a factores como la restricción en las cantidades de nutrientes especiales para su crecimiento (nitrógeno, fósforo, magnesio, entre otros micros y macros) en el medio (Lu et al., 2003).

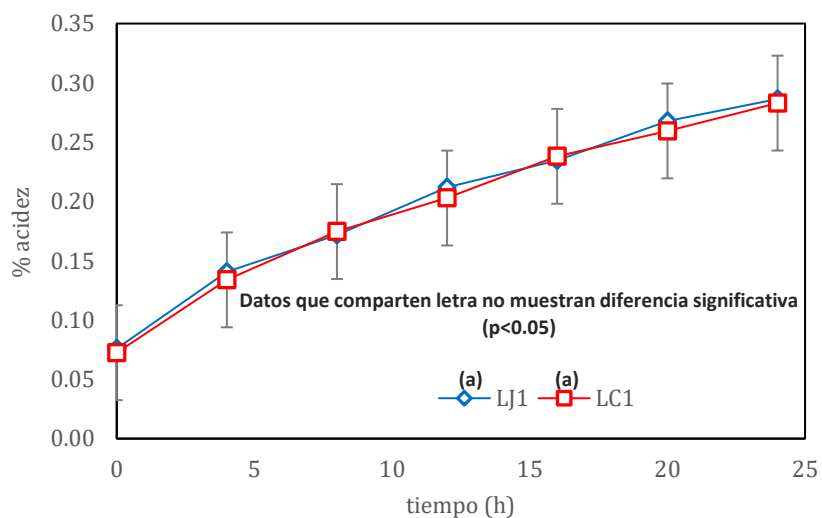


Figura 11. Cinética de producción de ácido láctico durante la fermentación de sacarosa al 10%.

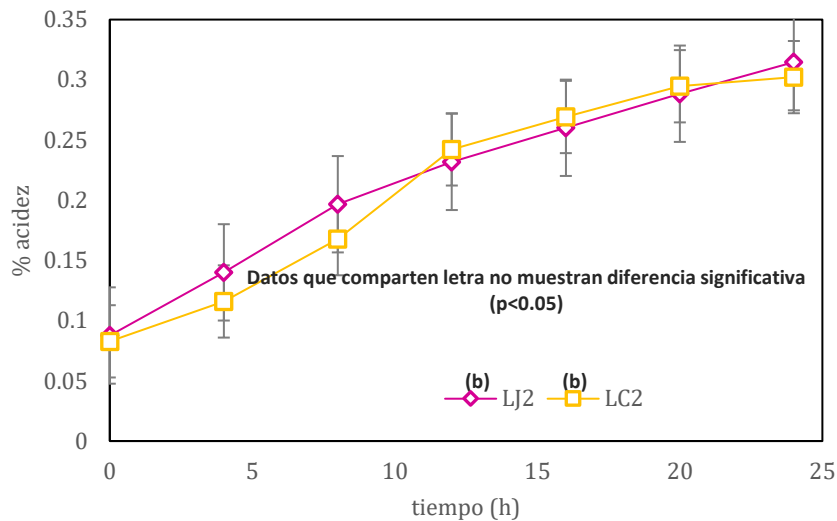


Figura 12. Cinética de producción de ácido láctico durante la fermentación de sacarosa al 15%.

7.5 Análisis microbiológicos a las bebidas fermentadas

Como parte del protocolo correspondiente y de normas que rigen los procesos de producción de alimentos y bebidas en todo el mundo, fue vitalmente importante la realización de pruebas y/o análisis microbiológicos a cada uno de los productos finales en relación a la efectividad de los cuidados y filtros de esterilidad general, desinfección del material y reducción de la posible microbiota dañina en la base vegetal. Por tal motivo se logró verificar las condiciones sanitarias de inocuidad garantizando la seguridad alimentaria al consumidor y permitiéndole aprovechar los efectos benéficos de los probióticos (**Figura 13**). Los análisis efectuados fueron: BMA (bacterias mesófilas aerobias), H-L (hongos-levaduras), CT y CF (coliformes totales y coliformes fecales). Los resultados obtenidos (*Tabla 9*) están dentro de los límites permitidos alimentarios mostrando cifras inferiores con respecto al recuento viable de cada cepa BAL (datos $\geq 1 \times 10^6$) de cada tratamiento, tomando como referencia la norma oficial mexicana para cada microorganismo antes mencionadas (NOM-093-SSA1-1994) y la norma respectiva de cultivos vivos del yogurt (Codex A-11[A]/1975; RD 179/2003; BOE 18/02/03).

Tabla 9. Análisis realizados a las bebidas después de 24 h de fermentación.

| Análisis microbiológico | | BAL | BMA | H-L | CT | CF |
|--|------------------------------|------------------|-------------|-----|--------|----|
| Límite permitido Log₁₀ (CFU) | | ≥6 | ≤3.7 | 1.0 | <2 | <3 |
| Unidades | | Log [CFU/mL o g] | | | NMP/mL | |
| Cepa-tratamiento | <i>L. casei</i> Shirota- 10% | 7.35±0.09 | 3.42 ± 0.12 | ND | ND | ND |
| | <i>L. casei</i> Shirota- 15% | 7.61±0.05 | 3.58 ± 0.12 | ND | ND | ND |
| | <i>L. jhonsonii</i> - 10% | 7.51±0.09 | 3.46 ± 0.07 | ND | ND | ND |
| | <i>L. jhonsonii</i> - 15% | 7.7±0.03 | 3.62 ± 0.01 | ND | ND | ND |

ND: no detectado, BMA: Mesófilos aerobios, H-L: Hongos-levaduras, CT: Coliformes totales, CF: Coliformes fecales

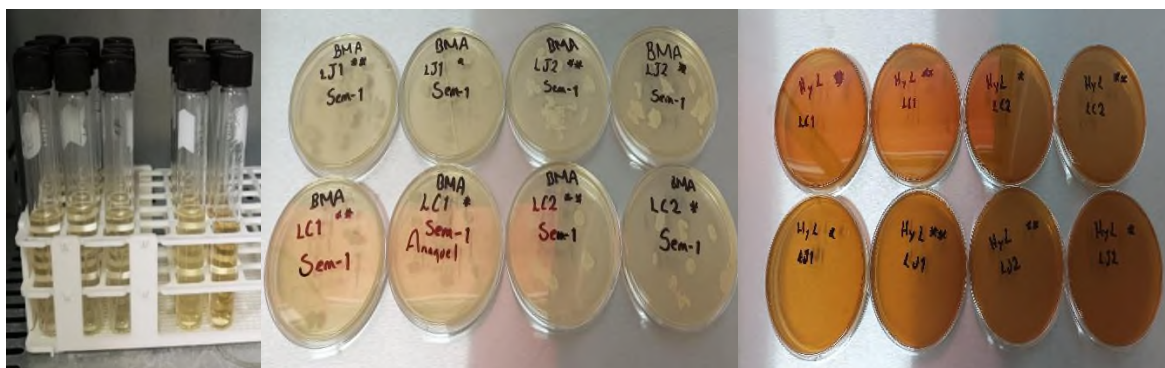


Figura 13. Análisis microbiológicos de calidad sanitaria realizados.

7.6 Prueba de aceptación sensorial

En general se obtuvieron resultados favorables en la evaluación de las bebidas (**Figura 14** y **Figura 15**) de ambas cepas, particularmente la audiencia tuvo una leve inclinación hacia las bebidas con mayor nivel de concentración de jarabe simple (consumidores de mayor dulzor) involucrando sensorialmente a los tratamientos LC2 y LJ2 resultando en mayor medida el gusto leve por el olor y textura (**Figura 19** y **Figura 21**) especiales de estas, además de retroalimentar con comentarios y sugerencias positivas tras el consumo e incluso un 37% y un 51% mencionó que posiblemente compraría cada bebida en caso de ser comercializada.

Los tratamientos LC1 y LJ1 obtuvieron mayor aceptación por la audiencia fit (aquella que no consume demasiados azúcares) destacando en mayor medida el gusto leve por los parámetros de sabor y color especial de estas (**Figura 18** y **Figura 20**), además de retroalimentar de igual manera con posibles mejoras de los productos (presentación y coloración), un 31% y un 49% resaltó sobre una posible compra de cada bebida en caso de ser comercializada, aunque significativamente en términos estadísticos se logró visualizar que las bebidas con mayor índice de aceptación en todos los parámetros evaluados fue la de la cepa *L. jhonsonii* (en especial la de 10%) destacando en ambos tratamientos (**Figura 16** y **Figura 17**).



Figura 14. Fermentación secundaria generada para todas las pruebas.



Figura 15. Sesión degustativa asistida por especialistas.

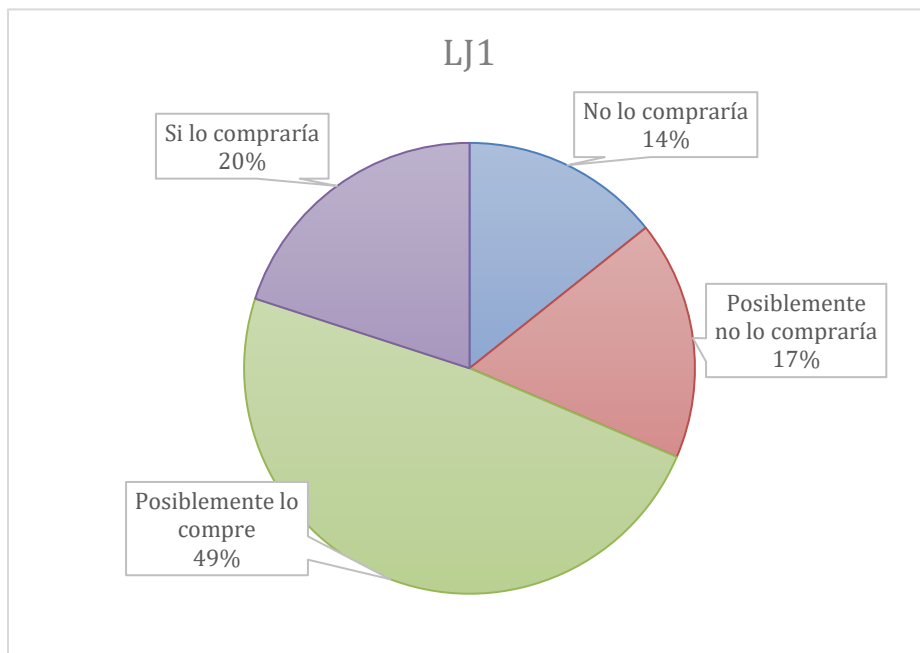


Figura 16. Calificación en categoría de compra para la primera bebida destacada.

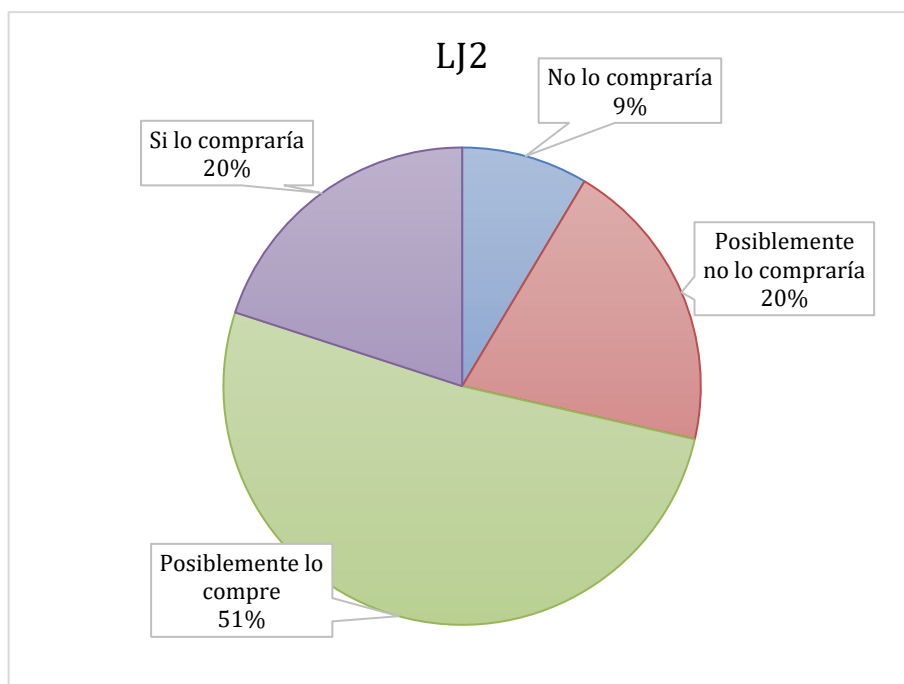


Figura 17. Calificación en categoría de compra para la segunda bebida destacada.

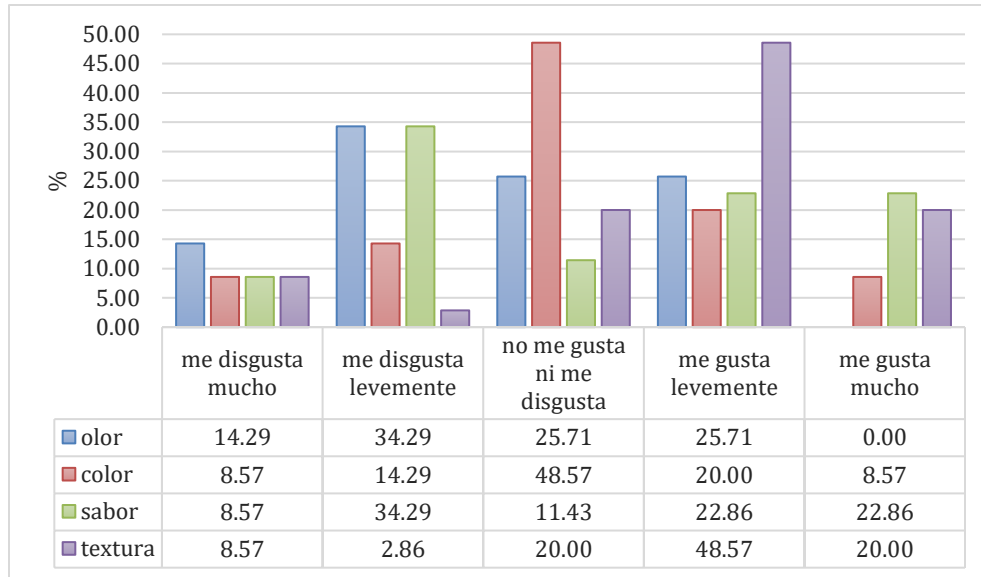


Figura 18. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con *L.casei Shirota* 10%

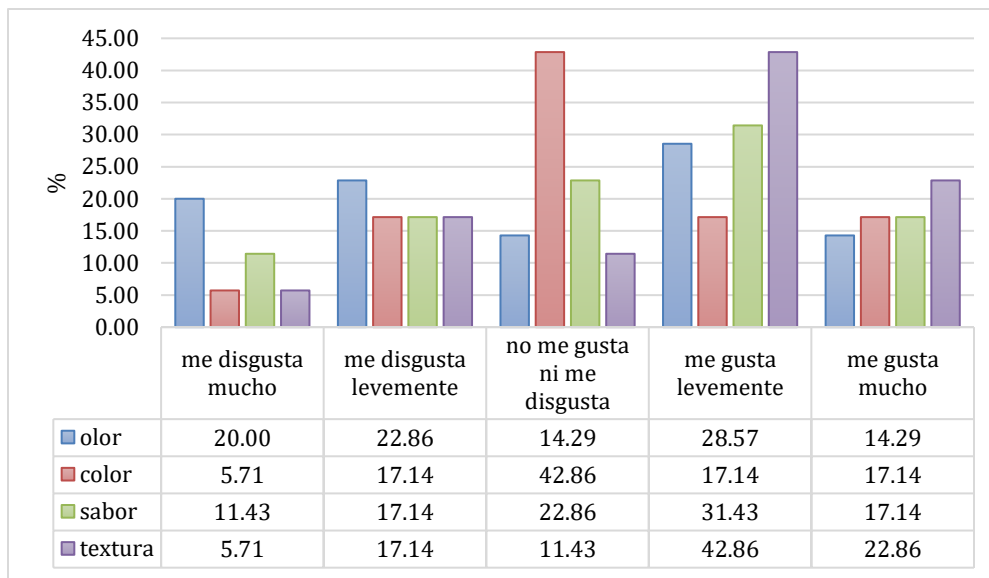


Figura 19. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con *L.casei Shirota* 15%

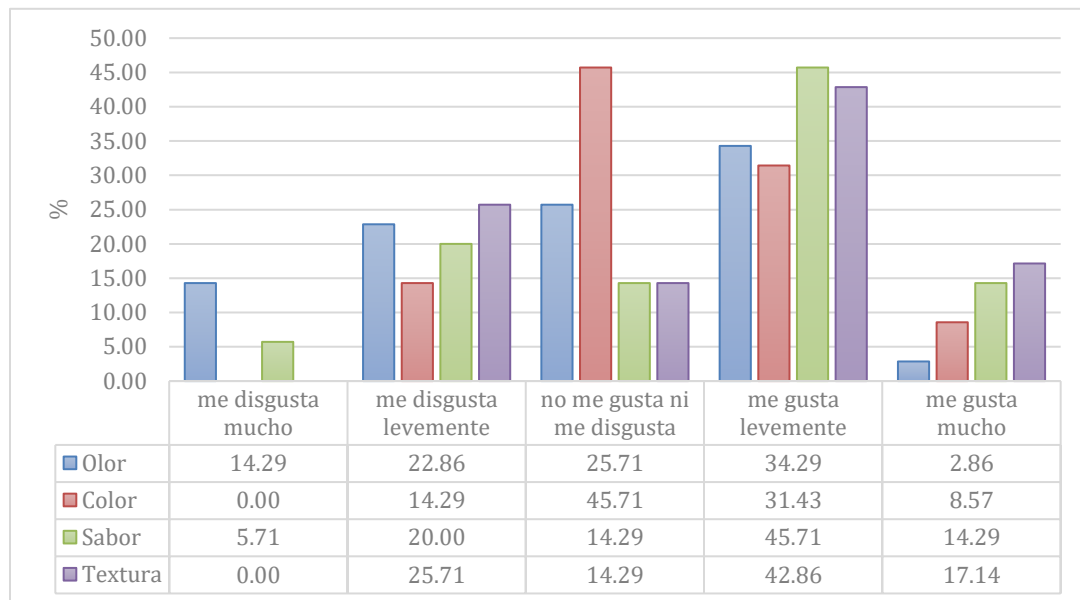


Figura 20. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con *L. jhonsoii* 10%.

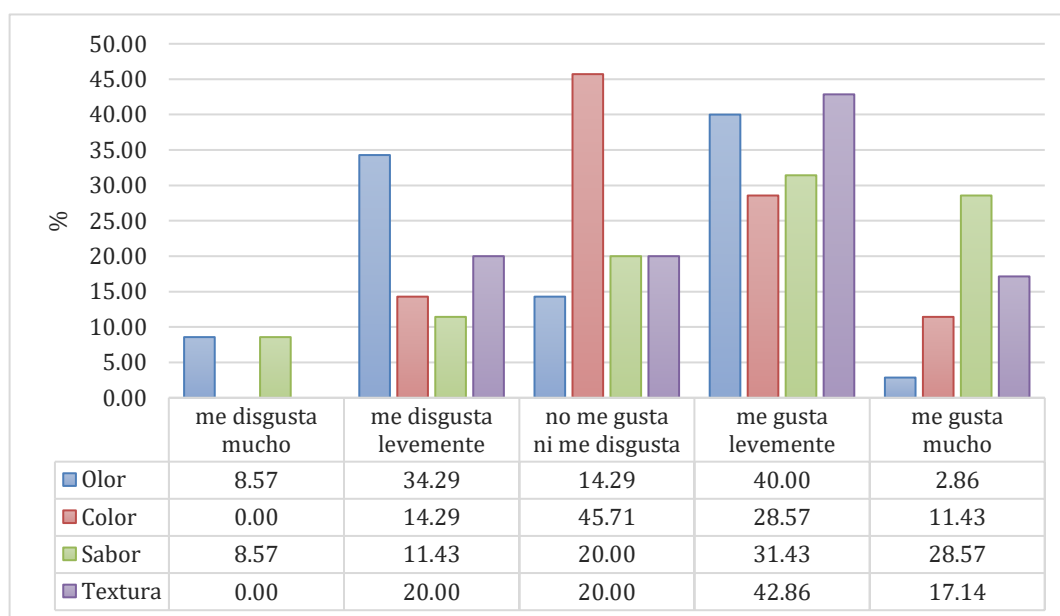


Figura 21. Estadístico evaluativo de los parámetros sensoriales en la bebida con *L. jhonsoii* 15%.

7.7 Determinación del contenido de fenoles totales

Se midió la absorbancia de las disoluciones de ácido gálico para generar una curva patrón (**Figura 22**) que sirvió para cuantificar las muestras sobresalientes del panel de evaluación sensorial LJ1 y LJ2 (Claves B y C) y una fracción de la infusión base vegetal (IB) antes de ser

fermentada. Todas las mediciones se realizaron a 760 nm por triplicado y con muestras previamente centrifugadas a 10000 rpm durante 10 min y retirando la masa celular para evitar fallos en el análisis. Se conoce químicamente que el reactivo de folin contiene molibdato y tungstato sódico que reaccionan con cualquier tipo de fenol formando complejos, fenómeno en el cual ocurre la transferencia de electrones a pH básico reduciendo los complejos en óxidos cromógenos de color azul intenso cuando es aplicado calor siendo proporcional al número de grupos hidroxilo de la molécula en cuestión (Muñoz-Bernal et al., 2017).

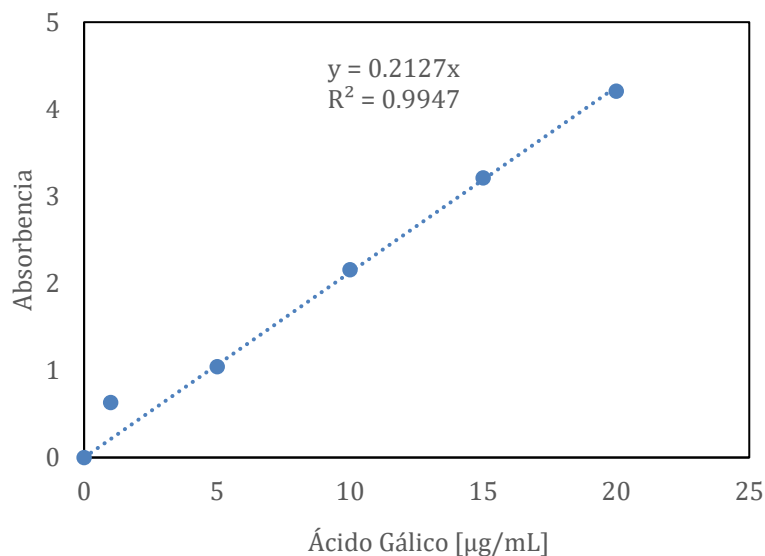


Figura 22. Curva estándar de ácido gálico

Inicialmente se realizó un ajuste en los volúmenes de muestra que debía agregarse a la mezcla de reacción para polifenoles utilizada en el método original. Esto fue necesario debido a la baja absorbancia registrada de las muestras en el rango de detección del espectrofotómetro. El volumen de muestra se incrementó 2, 4 y 8 veces para favorecer un buen resultado. Los datos finales ajustados del experimento mostraron diferencia numérica entre cada muestra evaluada y visualmente el patrón de coloración azul se fue intensificando según el tipo de tratamiento 10 y 15% (mayor cantidad de fenoles presentes) destacando el último de estos con mayor intensidad. Aunque en general se cumplió satisfactoriamente una de las características principales de estas cepas al incrementar el contenido de compuestos de interés biológico

(incluido los fenoles) posterior a la fermentación con respecto a los ya existentes en la infusión blanco dejando en claro el poder generativo que estas poseen. Considerando que el blanco tuvo una fracción muy pequeña también fue observado el patrón de coloración azul proporcional a la cantidad de fenoles aunque en proporciones muy diminutas siendo estas las de consumo habitual por el ser humano (**Figura 23**).

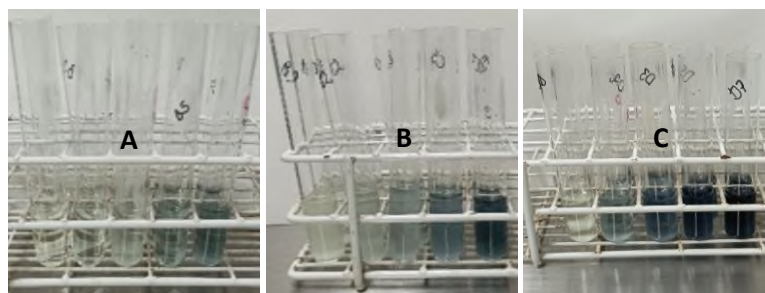


Figura 23. Contenido de fenoles totales presentes en las muestras A (IB), B (LJ1) y C (LJ2) cada una con diferente tonalidad azul por cada tubo de reacción (0, 5, 10, 20 y 40 µg/mL).

Tabla 10. Contenido de fenoles totales reales expresados en µg de ácido gálico por mL de muestra

| Muestra | OD Promedio | µg GA/mL | Comparativa | % incrementado |
|---------|-------------|------------|-------------|----------------|
| IB | 0.03575938 | 0.16814058 | LJ1/IB | 262.6 |
| LJ1 | 0.12966563 | 0.60968777 | LJ2/LJ1 | 71.0 |
| LJ2 | 0.2217375 | 1.04260973 | LJ2/IB | 520.0 |

Fuente: *elaboración propia*

El contenido de fenoles totales fue calculado a través de la ecuación de la recta pendiente de la curva estándar de ácido gálico la cual relaciona la absorbencia de la muestra con la concentración del estándar, despejando el valor de la variable independiente y por último expresando los datos en µg de ácido gálico por mL de muestra (*Tabla 10*). Finalmente ambos tratamientos incrementaron su contenido de fenoles en un 262 y 520% respectivamente en comparación a la infusión blanco, tal vez la presencia de estos compuestos no fue tan abundante considerando que se necesitó ajustar el método para lograrlo pero también intervienen factores como: la concentración de la infusión, la edad de la base vegetal, antigüedad de las cepas, disponibilidad de nutrientes, estrés osmótico e incluso existe la posibilidad de que el lento incremento obtenido en los tratamientos fuese derivado de algún mecanismo de supervivencia o desecho de las mismas cepas en el medio en que se encontraban. Se ha encontrado que productos aparentemente idénticos de *M. chamomilla*

mostraban una gran heterogeneidad en términos de extracción de rendimiento, composición química y efectos antioxidantes (Catani et al., 2021). También se ha demostrado que el contenido de polifenoles se incrementa durante la fermentación. Por ejemplo, se ha comprobado la capacidad de la fermentación, con levaduras y *Lactobacillus*, para aumentar el contenido de compuestos fenólicos durante la fermentación de mijo (Balli et al., 2020). En otros estudios también se demostró que la fermentación ácido-láctica permitió aumentar las concentraciones de fenoles totales, flavonoides y antocianinas, que fueron de 5 a 10 veces más altas que las encontradas para el control no fermentado y acidificado químicamente (Curiel et al., 2015). La capacidad de *L. plantarum* para degradar compuestos polifenólicos ya fue documentada y considerada como una estrategia metabólica para adaptarse a nichos ambientales hostiles (Aguilera-Carbo et al., 2008). Además Curiel et al. (2015), encontraron que todos los ácidos fenólicos aumentaron, pero principalmente los ácidos gálico y elálgico. Ambos compuestos pueden liberarse a través de la actividad tanasa. La tanasa o tanino acil hidrolasa (EC 3.1.1.20) cataliza la hidrólisis de enlaces éster que están presentes en taninos hidrolizables y ésteres de ácido gálico por lo que la presencia de fuentes ricas en carbono y si existen compuestos fenólicos (mencionando a las bebidas con la infusión) en un medio fermentativo permitiría a estos microorganismo la perfecta degradación de los galotaninos con esta enzima lo que indudablemente ocasionaría un gasto energético elevado dependiendo de cuantos compuestos estén ahí (asumiendo que ocurrió este fenómeno en el presente estudio). Por lo tanto, se determinó que existe efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el contenido de polifenoles totales presentes en la incorporación de ambos tratamientos de la muestra respecto al blanco.

7.8 Viabilidad de las bebidas fermentadas

Parte crucial de las distintas pruebas realizadas en alimentos involucra la comprobación de la vida de anaquel que estos poseen y por tal motivo se realizó dicho proceso en condiciones de tiempo y temperatura controlados (refrigeración a 4° C; durante 4 semanas). Los resultados obtenidos mostraron una evidente disminución de las cuentas viables de BAL en general de las bebidas de las dos cepas (*L. jhonsonii* & *L. casi Shirota*) en ambos tratamientos (10 & 15% p/v) a través del tiempo, tomándose alícuotas de cada muestra a los 0, 7, 14, 21 hasta finalizar los 28 días (4 semanas). Particularmente los cultivos lácticos de las bebidas LC1 y LC2 redujeron

gradualmente su viabilidad comenzando con cifras logarítmicas de 6.84 y 7.06 respectivamente hasta 6.0 y 6.15 finalizado el periodo de 4 semanas, por otra parte las bebidas LJ1 y LJ2 también redujeron su viabilidad de cultivos iniciando con valores de 6.93 y 7.20 respectivamente hasta 6.15 y 6.30 al término del periodo (**Figura 24** y **Figura 25**), los datos generales registrados del experimento están representados en la (*Tabla 11*).

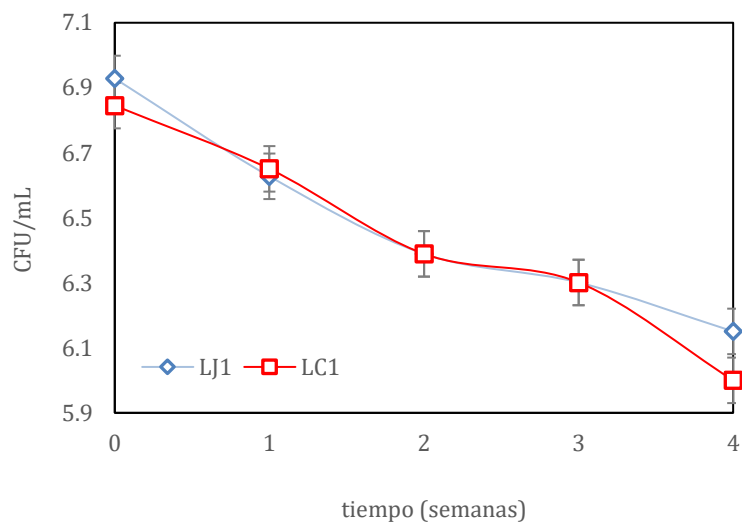


Figura 24. Cinética microbiana de la vida de anaquel de la bebida probiótica expresada como CFU/mL en un medio con sacarosa al 10%.

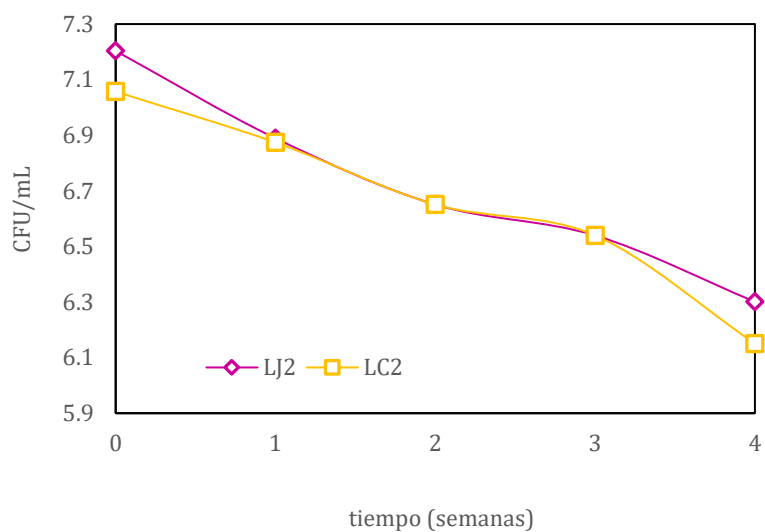


Figura 25. Cinética microbiana de la vida de anaquel de la bebida probiótica expresada como CFU/mL en un medio con sacarosa al 15%.

Aunque las condiciones de fermentación fueron diferentes para comodidad de sus operarios, la disminución de la calidad de las bebidas no fue tan severa como se esperaba pues aún con la presencia de factores anteriormente mencionados estas mantuvieron aun presentes sus características sensoriales (**Figura 26**). Para que un alimento sea considerado como probiótico generalmente debe estar por encima de $>10^6$ - 10^8 o 10^8 - 10^{10} CFU/mL de cada dosis ingerida (*Sánchez et al., 2015*), respetando este criterio cada bebida generada mostró ser viable en las condiciones evaluadas para el crecimiento de BAL probióticas. Otras causas en la disminución de viabilidad de los organismos probióticos pueden depender del nivel de oxígeno en los productos, permeabilidad de oxígeno del envase, la manipulación, disminución del pH del medio, la acumulación de ácido orgánico como resultado del crecimiento (*Obando et al., 2010*).

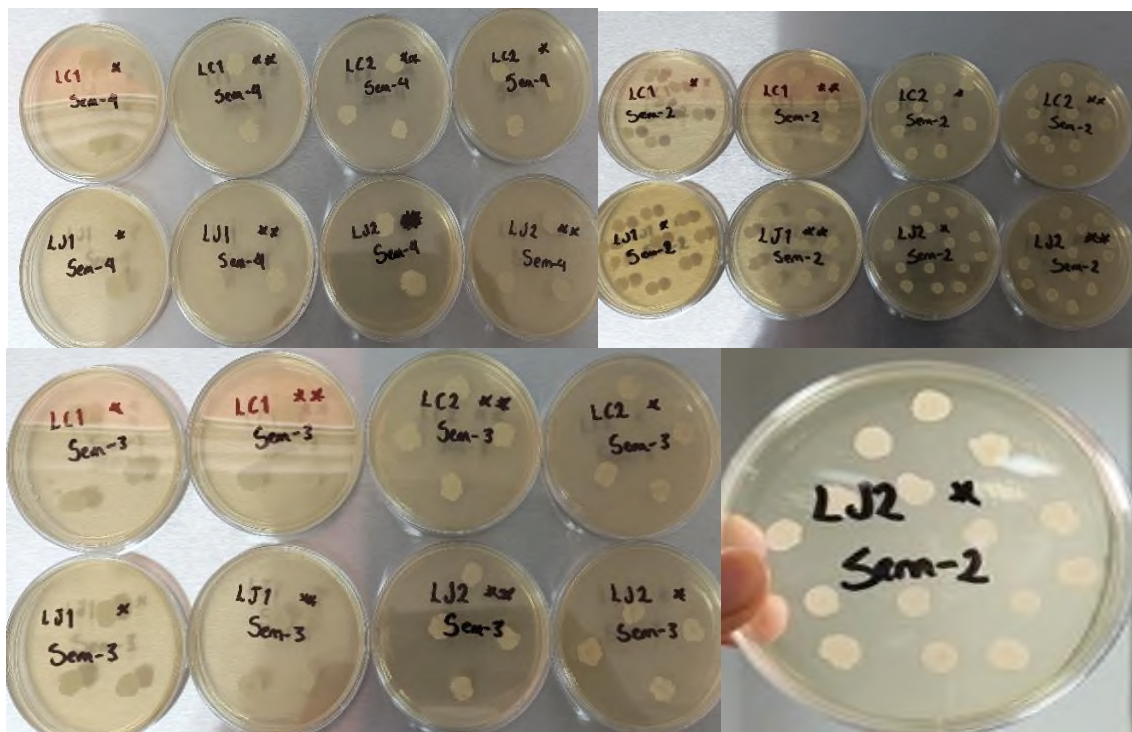


Figura 26. Monitoreo de la vida de anaquel mediante conteo microbiano durante 4 semanas.

Tabla 11. Viabilidad de los cultivos de BAL de ambos tratamientos almacenadas a 4 °C.

| Viabilidad [Log (CFU/mL)] | | | | | | |
|---------------------------|---|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Cepa | Tratamiento T.d.r (d ⁻¹) | tiempo (semanas) | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>L. casei</i> Shirota | 10% 0.2389 | 6.84±0.01 | 6.65±0.04 | 6.38±0.08 | 6.30±0.01 | 6.00±0.01 |
| | 15% 0.2970 | 7.06±0.05 | 6.87±0.02 | 6.65±0.04 | 6.54±0.06 | 6.15±0.07 |
| <i>L. jhonsonii</i> | 10% 0.2458 | 6.93±0.02 | 6.63±0.03 | 6.39±0.08 | 6.30±0.01 | 6.15±0.09 |
| | 15% 0.2986 | 7.20±0.02 | 6.89±0.11 | 6.65±0.04 | 6.54±0.06 | 6.30±0.01 |

Fuente: elaboración propia

Abb: Tasa de reducción (T.d.r)

8. Conclusiones

Dado los resultados procedentes de cada estudio realizado en las muestras se observó que la viabilidad celular de cada una fue relativamente buena aunque pudo haber sido mejor con la adición o fortificación de otros macros y micronutrientes pero modificando indirectamente el concepto de bebida convencional fermentada, cualquier idea o sugerencia es superponible a realizar siempre y cuando se ajuste a la disposición y accesibilidad de sus practicantes.

De los parámetros considerados en el experimento se encontró que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en la incorporación de los dos niveles de jarabe de sacarosa (10 y 15 % p/v) en las cepas de las BAL (*L. casei Shirota* & *L. jhonsonii*) de las bebidas de infusión estandarizada de Manzanilla (sin embargo puede seleccionarse cualquier cepa libremente al no existir diferencia significativa si se considera un solo tipo de tratamiento). Además la elección final se dejó con base en los resultados sensoriales del panel estadístico (LJ1 mejor calificada). La calidad sanitaria de todas las bebidas fue aceptable, ya que los resultados de los análisis microbiológicos realizados (mesófilos aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales) cumplieron los estándares permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas además de ser microbiológicamente estable en condiciones de almacenamiento frío a 4 °C durante 4 semanas. La disminución del pH, la producción de acidez total y la velocidad de crecimiento fueron proporcionales al tipo de tratamiento en cada cepa no obstante podría cambiarse el tipo de tratamiento por otras concentraciones, otros microorganismos e incluso una base vegetal distinta para observar la influencia que tiene sobre las variables estudiadas. En cuanto al contenido de fenoles totales de las muestras analizadas se encontró que también existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) que afecta sobre la cantidad de fenoles totales presentes al incorporar ambos tratamientos respecto al blanco, aunque esto no establece un mayor uso de jarabe de sacarosa como sustrato en los cultivos de BAL para obtener más fenoles sin respetar los demás factores.

9. Perspectivas

Nuevas investigaciones deben ser realizadas para verificar la eficacia de utilizar cepas diferentes o cultivos mixtos, probar la viabilidad de bases vegetales diferentes (preferentemente aquellas que posean colorantes naturales atractivos) e inclusive distintas concentraciones de sustrato dependiendo de los objetivos a cumplir.

Asimismo es recomendable el uso de proteína exógena u otros aditivos especiales estimulantes para las bacterias y que estas a su vez puedan tener un mejor desempeño fermentativo dando como resultado un producto único con gran potencial alimenticio.

10. Bibliografía

- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L.A. et al. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Apply Microbioly Biotechnology* 78, 189–199 <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1276-2>
- Ajibola, O. O., Lihan, S., Hussaini, A., Saat, R., Ahmed, I. A., Abideen, W., Sinang, F. M., sing, N. N., & Adeyinka, G. C. (2020). Toxicity Assessment of *Lactococcus lactis* IO-1 Used in Coconut Beverages against *Artemia salina* using Brine Shrimp Lethality Test. *Applied Food Biotechnology*, 7(3). <https://doi.org/10.22037/afb.v7i3.29346>
- Ajibola, O. O., Lihan, S., Saat, R., Husain, A. A. S. A., Adewale, I. A., Abideen, W. A., Mohammad, F. S. (2020). Use of the *Lactococcus lactis* IO-1 for developing a novel functional beverage from coconut water. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati Fascicle VI – Food Technology*, 44(1), 118–131. <https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2020.1.07>
- Alkhatib, A., Tsang, C., Tiss, A., Bahorun, T., Arefanian, H., Barake, R., Khadir, A., & Tuomilehto, J. (2017). Functional Foods and Lifestyle Approaches for Diabetes Prevention and Management. *Nutrients*, 9(12), 1310. <https://doi.org/10.3390/nu9121310>
- AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis*, 17th edition. Association of official Analytical Chemists, Washington, D.C. ISBN-10: 093558467-6. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/z423645>
- Armstrong, G. A. (1999). Quantitative Descriptive Analysis (QDA). Utilising the human instrument. *Nutrition & Food Science*, 99(6). <https://doi.org/10.1108/nfs.1999.01799faf.001>
- Badui Dergal, S. (2006). *Quimica de los alimentos*. Pearson Education. 4th edición. ISBN: 970-26-0670-5.
- Balli, D., Bellumori, M., Pucci, L., Gabriele, M., Longo, V., Paoli, P., Melani, F., Mulinacci, N., & Innocenti, M. (2020). Does Fermentation Really Increase the Phenolic Content in Cereals A

- Study on Millet. Foods (Basel, Switzerland), 9(3), 303.
<https://doi.org/10.3390/foods9030303>
- Brighente, I. M. C., Dias, M., Verdi, L. G., & Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, 45(2), 156–161.
<https://doi.org/10.1080/13880200601113131>
- Castro-Carranza, J. D., Vera Rodríguez, L. R., Cedeño Palacios, C. A., & Dueñas Rivadeneira, A. A. (2020). Bebida funcional a base de pitahaya (*Hylocereus undatus*) y extractos de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y albahaca (*Ocimum tenuiflorum*). *Revista Técnica De La Facultad De Ingeniería Universidad Del Zulia*, ve2020(2), 90–95.
<https://doi.org/10.22209/rt.ve2020n2a13>
- Catani, M. V., Rinaldi, F., Tullio, V., Gasperi, V., & Savini, I. (2021). Comparative Analysis of Phenolic Composition of Six Commercially Available Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) Extracts: Potential Biological Implications. *International journal of molecular sciences*, 22(19), 10601. <https://doi.org/10.3390/ijms221910601>
- Chinachoti, N., Matsusaki, H., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (1998). Nisin Z Production by *Lactococcus lactis* IO-1 Using Xylose as a Carbon Source. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62(5), 1022–1024. <https://doi.org/10.1271/bbb.62.1022>
- Cruz-Uriarte, Y.O., (2017). “Obtención de bebidas fermentadas de hierbas aromáticas y medicinales a partir de bacterias lácticas probióticas” [Tesis de Licenciatura, Universidad del Papaloapan].
- Curiel, J.A., Pinto, D., Marzani, B. et al. Lactic acid fermentation as a tool to enhance the antioxidant properties of *Myrtus communis* berries. *Microb Cell Fact* 14, 67 (2015).
<https://doi.org/10.1186/s12934-015-0250-4>
- Ćwieląg-Drabek, M., Piekut, A., Szymala, I., Oleksiuk, K., Razzaghi, M., Osmala, W., Jabłońska, K., & Dziubanek, G. (2020). Health risks from consumption of medicinal plant dietary

supplements. *Food Science & Nutrition*, 8(7), 3535–3544.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1636>

Domínguez-Magaña, M. A. (2006). Fermentación con bacterias lácticas probióticas. [Tesis de Maestría: Universidad Autónoma de Yucatán].

Espinoza, S. M. (2021). Compuestos químicos y aplicaciones cosméticas de la manzanilla (*Matricaria chamomilla L.*). Unidad de investigación y desarrollo, ProdInves, Cochabamba, Bolivia, 8. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.20532.99204>

Formentini, E. (2017). La persistencia bacteriana: Una problemática ignorada por una ciencia sin respuestas. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 16(2), 74–82.
<https://doi.org/10.14409/favecv.v16i2.6833>

Frazier, W. C. (1993). Microbiología de los alimentos (4ta ed.). Acribia, S.A. Zaragoza. ISBN: 84-2004734-X.

Fuentes-Berrío, Lorenzo, Acevedo-Correa, Diofanor, & Gelvez-Ordóñez, Víctor Manuel. (2015). Alimentos funcionales: impacto y retos para el desarrollo y bienestar de la sociedad colombiana. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13(2), 140-149.
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(13\)140-149](https://doi.org/10.18684/BSAA(13)140-149).

Gadhoumi, H.; Gullo, M.; De Vero, L.; Martínez-Rojas, E.; Saidani Tounsi, M.; Hayouni, E.A. Design of a New Fermented Beverage from Medicinal Plants and Organic Sugarcane Molasses via Lactic Fermentation. *Appl. Sci.* (2021), 11, 6089.
<https://doi.org/10.3390/app11136089>.

González, B. A., Domínguez-Espinosa, R., & Alcocer, B. R. (2008). Use of *Aloe vera* juice as substrate for growth of *L. plantarum* and *L. casei*. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 2(6), 152-157. ISSN: 1135-8122. <https://www.redalyc.org/pdf/724/72411971009.pdf>.

Guillot, C. C. (2018). Probióticos, puesta al día. *Revista Cubana de Pediatría.*, 13. ISSN: 1561-3119. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v90n2/ped09218.pdf>.

- Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Ksouri, R., Medini, F., Sekkal, F. Z., & Benmansour, A. (2014). Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic extracts of *Helichrysum stoechas* subsp. Rupestris and *Phagnalon saxatile* subsp. Saxatile. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12(6), 415–422. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60065-0](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60065-0)
- Hitchins, D. y col. (1992) *Escherichia coli* and the coliform bacteria. FDA. Bacteriological Analytical Manual. 7th edition. AOAC International: 27-77.
- Kantachote, D., Ratanaburee, A., Hayisama-ae, W., Sukhoom, A., & Nunkaew, T. (2017). The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. *Journal of Functional Foods*, 32, 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.018>
- Kato, H., Shiwa, Y., Oshima, K., Machii, M., Araya-Kojima, T., Zendo, T., Shimizu-Kadota, M., Hattori, M., Sonomoto, K., & Yoshikawa, H. (2012). Complete Genome Sequence of *Lactococcus lactis* IO-1, a Lactic Acid Bacterium That Utilizes Xylose and Produces High Levels of L-Lactic Acid. *Journal of Bacteriology*, 194(8), 2102–2103. <https://doi.org/10.1128/JB.00074-12>
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 25(4), 726–732. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>
- Leos-Malagon, A. S., Saavedra-Cruz, R. D., & Viveros-Valdez, E. (2020). Plantas aromáticas posiblemente útiles contra el SARS-CoV-2 (Covid-19). *Sociedad Venezolana de Farmacología Clínica y Terapéutica*, 39, 14. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4406779>
- Lu, Z., Breidt, F., Plengvidhya, V., & Fleming, H. P. (2003). Bacteriophage Ecology in Commercial Sauerkraut Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3192–3202. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.6.3192-3202.2003>

- Machado, K. (2020). Uso de probióticos en el tratamiento y la prevención de diarrea aguda en niños. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 91(1). <https://doi.org/10.31134/AP.91.1.6>
- Manzano A, C., Estupiñán G, D., & Poveda E, E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1), 98–110. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>
- Ma X, Zhao D, Li X, Meng L. (2015). Chromatographic method for determination of the free amino acid content of chamomile flowers. *Pharmacogn Mag. Jan-Mar*;11(41):176-9. PMID: 25709230; PMCID: PMC4329621. [doi: 10.4103/0973-1296.149735](https://doi.org/10.4103/0973-1296.149735)
- Marco, M. L., Sanders, M. E., Gänzle, M., Arrieta, M. C., Cotter, P. D., De Vuyst, L., Hill, C., Holzapfel, W., Lebeer, S., Merenstein, D., Reid, G., Wolfe, B. E., & Hutkins, R. (2021). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(3), 196–208. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Muñoz-Bernal, Ó. A., Torres-Aguirre, G. A., Núñez-Gastélum, J. A., de la Rosa, L. A., Rodrigo-García, J., Ayala-Zavala, J. F., & Álvarez-Parrilla, E. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *tip*, 20(2), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.04.003>
- Naissinger da Silva, M., Tagliapietra, B. L., Flores, V. do A., & Pereira dos Santos Richards, N. S. (2021). In vitro test to evaluate survival in the gastrointestinal tract of commercial probiotics. *Current Research in Food Science*, 4, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.04.006>
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa: 12,12,95.

NOM-093-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos: 12,12,92.

NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Toma, manejo y transporte de muestras: 10,16,95.

NOM-111-SSA1-1994. Determinación de hongos y levaduras para un alimento:10,16,95.

NOM-112-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del NMP: 11,16,95.

Obanco, M., Brito, C., Schobitz, R., Baez, L., Horzella, M. (2010). Viabilidad de los microorganismos probióticos *Lactobacillus casei* 01, *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Bifidobacterium* BB12, durante el almacenamiento de queso cottage. Revista de la facultad de química farmacéutica, 141-148. ISSN: 0121-4004. Disponible en <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815396005>

Ocampo R. A. (2002). Situación actual del comercio de plantas medicinales en América Latina. Boletín latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas, 1(4), 35-40. ISSN: 0717-7917. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/856/85610403.pdf>

Palomino, G., García, P., Gil, G., Rojano, B., Durango, R. (2009). Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from antioquia (colombia). Vitae [online], vol.16, n.3, pp.388-395. ISSN: 0121-4004. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/vitae/article/view/3020/0>

Pérez-Loaiza, B. (2013). "Elaboración de una bebida funcional a base de hierba luisa, manzanilla y toronjil" [Licenciatura, Universidad católica de santa maría, Perú]. <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/4446>

Pereira, P.F. (1988). Acidez cómo % ácido láctico. En: Alimentos. Manual de análisis fisicoquímicos. Ed. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México: 26-28.

- Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Repositorio Institucional Aramara, 7, 16. ISSN: 2007-0713. <http://dspace.uan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/436>
- Rodarte, C. W. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. Revista Digital Universitaria, 15, 14. ISSN: 1607-6079. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-digital-universitaria/articulo/la-biotecnologia-alimentaria-antigua-los-alimentos-fermentados>
- Romero, C., & Camargo, J. (2007). Determinación por cromatografía Líquida (HPLC) del contenido de ácido fólico y hierro en una bebida láctea fermentada tipo yogurt enriquecida a partir de materias primas naturales. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 5(2), 42–48. ISSN: 0120-4211. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90350204>
- Salamanca G, G., Osorio T, M. P., & Montoya, L. M. (2010). Elaboración de una bebida funcional de alto valor biológico a base de borjón (*Borojoa patinoi Cuatrec*). Revista Chilena de Nutrición, 37(1). <https://doi.org/10.4067/S0717-75182010000100009>
- Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. Antonie van Leeuwenhoek, 70(2–4), 347–358. <https://doi.org/10.1007/BF00395941>
- Sánchez, M. T., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microorganismos probióticos y salud. Ars Pharmaceutica (Internet), 56(1), 45–59. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000100007>
- Sharma, V., & Mishra, H. N. (2013). Fermentation of vegetable juice mixture by probiotic lactic acid bacteria. Nutrafoods, 12(1), 17-22. ISSN: 1827-8590. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13749-012-0050-y>

- Shuller, M.L. y Kargi, F. (2002). *Bioprocess Engineering. Basic concepts*. 2ª Edition. Prentice may international series in the Physical and Chemical Engineering Sciences:112-168. ISBN: 0-13-081908-5.
- Siuta-Cruce, P. (2001). Improving probiotics survival rates. *Food technology*, 55(10), 36-43. <https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2001/october/features/improving-probiotic-survival-rates>
- Tantipaibulvut, S., Soontornsophan, C., Luangviphusavanich, S. (2008). Fermentation of roselle juice by BAL. *Food and Agroindustry*, 1(04), 213-222. ISSN: 1906.3040. <https://www.ajofai.info/abstract/fermentation%20of%20roselle%20juice%20by%20lactic%20acid%20bacteria.pdf>
- Topolska, K., Florkiewicz, A., & Filipiak-Florkiewicz, A. (2021). Functional Food—Consumer Motivations and Expectations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10), 5327. <https://doi.org/10.3390/ijerph18105327>
- Tortora G. J., B. R. Funke and Ch. L. Case 2007. *Introducción a la Microbiología* 9ª. Edición. Editorial medica panamericana. ISBN: 9789500695404
- Vanderzant and Splittstoesser, F. D. (1992). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*: 94-135. ISBN: 0875531733
- Vara-Delgado, A., Sosa-González, D. R., Alayón-Recio, C. S., Ayala-Sotolongo, N., & Moreno-Capote, D. G. (2019). Uso de la manzanilla en el tratamiento de las enfermedades periodontales. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 23(3), 403-414. ISSN: 1025-0255. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552019000300403
- Vinson, J. A., Hao, Y., Su, X., & Zubik, L. (1998). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3630–3634. <https://doi.org/10.1021/jf980295o>

Wu, H., Yang, K., Dong, L., Ye, J., & Xu, F. (2022). Classification, Distribution, Biosynthesis, and Regulation of Secondary Metabolites in *Matricaria chamomilla*. *Horticulturae*, 8(12), 1135. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121135>

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 38(1), 73–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.008>