



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Terra Uerrima Mens Aperta

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Obtención de bebidas fermentadas de hierbas aromáticas y medicinales a partir de bacterias lácticas probióticas”

T E S I S

Presenta:

Yamil Oswaldo Cruz Uriarte

**Para obtener el título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

Director:

Dr. Mario Alberto de Jesús Domínguez
Magaña

Co-directora:

Dra. Fabiola Hernández
Sánchez

San Juan Bautista, Tuxtepec Oaxaca, 2017.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

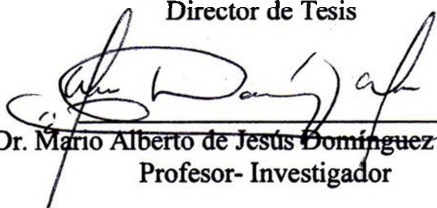
En la Ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 27 de Marzo del 2017 a las 12:00 hr, se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de la carrera de **Ingeniería en Biotecnología** de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada **Obtención de bebidas fermentadas de hierbas aromáticas y medicinales a partir de bacterias lácticas probióticas** presentado por el alumno **Yamil Oswaldo Cruz Uriarte**, con número de matrícula **10090004**, aspirante al grado 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, Oax., a 27 de Marzo del 2017.

ATENTAMENTE. LA COMISIÓN REVISORA


Director de Tesis


Dr. Mario Alberto de Jesús Domínguez Magaña
Profesor- Investigador

Co-Director de Tesis


Dra. Fabiola Hernández Sánchez
Profesor- Investigador

Presidente


Dra. María de Jesús García Gómez
Profesor- Investigador

Secretario


Dra. Ariana Arlene Huerta Heredia
Profesor- Investigador

Vocal


Dr. Andrés Aguirre Cruz
Profesor- Investigador

Con especial dedicataria:

A mi madre Herminia que más allá de apoyarme en mis estudios, me ha regalado muchos de sus días y sus noches, tantos como la luna a acompañado a las estrellas, con fortaleza en tiempos difíciles, a su esposo Aurelio por compartirme su sabiduría sin indiferencia como sólo un padre enseña a un hijo demostrándome una nueva perspectiva y pensamiento para convivir en familia, ambos me han regalado la invaluable herencia del estudio, a mi hermano Miguel que aún sin darse cuenta fue parte importante para la culminación de este trabajo.

De todo corazón y cariño sincero.

Yamil Osvaldo Cruz Uriarte.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por bendecirme y acompañarme en mis días más grises, por darme fuerza en un punto en el que yo pensé que ya no lograría nada.

A la Universidad del Papaloapan por la oportunidad de estudiar una carrera profesional y facilitarme las instalaciones para realizar el trabajo.

A mi director de tesis Dr. Mario Alberto de Jesús Domínguez Magaña por brindarme su enseñanza, compartirme su conocimiento y su amistad.

A mi co-directora de tesis Dra. Fabiola Hernández Sánchez por brindarme su apoyo en la elaboración de esta tesis de igual manera por su amistad.

A mis profesores por compartirme sus conocimientos y ser parte fundamental de mi formación profesional, a cada uno de ellos se les recuerda y agradece (Cuerpo académico de Biotecnología, Alimentos y Ciencias Químicas, C. Empresariales, Idiomas).

A mis sinodales Dra. María de Jesús, Dr. Andrés, Dra. Ariadna, Dra. Karim, Dra. Jaqueline por apoyarme y ser parte fundamental de este proyecto.

A los responsables de los laboratorios Juan y Lety por todas las facilidades.

Y por último pero no menos importante a mi familia de 5 años mis compañeros de Ingeniería, ¡ todo el éxito para nosotros chicos !

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Alimento funcional.....	3
2.2	Microorganismos probióticos.....	4
2.3	Efectos benéficos de los probióticos en la salud.....	6
2.4	Fermentación de alimentos.....	7
2.5	Alimentos fermentados con probióticos.....	8
2.6	Fermentación de vegetales con bacterias lácticas probióticas.....	10
2.7	Uso de hierbas aromáticas y vegetales en México.....	12
2.8	Características generales de las plantas empleadas para este estudio.....	13
2.8.1	<i>Mentha piperita</i>	13
2.8.2	<i>Cymbopogon citratus</i>	14
2.8.3	<i>Citrus limon</i>	16
2.8.4	Cepas de bacterias probióticas.....	17
3	JUSTIFICACIÓN	19
4	HIPÓTESIS	19
5	OBJETIVOS	20
5.1	General.....	20
5.2	Particulares.....	20
6	MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1	Estrategia experimental.....	21
6.2	Obtención de las materias primas.....	25
6.2.1	Preparación de las formulaciones a partir de hierbas.....	25
6.2.2	Cepas de BAL empleadas.....	25
6.3	Análisis proximales de las hierbas.....	25
6.4	Preparación del inóculo.....	27
6.5	Metodología de las fermentaciones.....	27
6.6	Diseño estadístico a emplear.....	29

6.7	Cálculo de la tasa de crecimiento bacteriano	29
6.8	Cuantificación del consumo de azúcares totales	30
6.9	Determinación de pH	30
6.10	Determinación del % de acidez titulable	30
6.11	Tolerancia a pH ácido	31
6.12	Análisis de la calidad sanitaria de la bebida	32
6.12.1	Mesófilos aerobios	32
6.12.2	Coliformes totales	32
6.12.3	Coliformes fecales	33
6.12.4	Hongos y levaduras	33
6.13	Análisis de viabilidad durante el almacenamiento de las bebidas fermentadas	33
6.14	Análisis estadístico de los datos experimentales	34
7	RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
7.1	Análisis proximales de las hierbas	35
7.2	Cuentas viables (UFC/ml)	36
7.3	Velocidad de crecimiento μ	40
7.4	pH	41
7.5	% de acidez titulable	44
7.6	Crecimiento y tolerancia a pH ácido	46
7.7	Análisis microbiológicos a las bebidas fermentadas	47
7.8	Viabilidad de la bebida fermentada (4 Semanas)	48
8	CONCLUSIONES	50
9	PERSPECTIVAS	51
10	BIBLIOGRAFÍA	52

Índice de figuras

Figura 1. Hojas de hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>)	14
Figura 2. Zacate de limón (<i>Cymbopogon citratus</i>)	16
Figura 3. Hojas de limón (<i>Citrus limon</i>)	17
Figura 4. Diagrama para evaluar la fermentación	22
Figura 5. Diagrama para evaluar la fermentación, sin jarabe simple	23
Figura 6. Diagrama para evaluar la fermentación, sin inóculo	24
Figura 7. Consumo de azúcares y cuentas viables de BAL de <i>L. casei Shirota</i> , obtenido con cada una de las tres hierbas, después de 48 h de fermentación	38
Figura 8. Consumo de azúcares y cuentas viables de BAL de <i>L. Johnsonii</i> , obtenido con cada una de las tres hierbas, después de 48 h de fermentación	39
Figura 9. Consumo de azúcares y cuentas viables de BAL de <i>L. plantarum</i> , obtenido con cada una de las tres hierbas, después de 48 h de fermentación	39
Figura 10. Velocidad de crecimiento	41
Figura 11. Comportamiento del pH de <i>L. casei Shirota</i> después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas.....	42
Figura 12. Comportamiento del pH de <i>L. Johnsonii</i> después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas	43
Figura 13. Comportamiento del pH de <i>L. plantarum</i> después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas	43
Figura 14. Comportamiento del % acidez de <i>L. casei Shirota</i> después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas	45
Figura 15. Comportamiento del % acidez de <i>L. Johnsonii</i> después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas.....	45
Figura 16. Comportamiento del % de acidez de <i>L. plantarum</i> después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas	46

Índice de tablas

Tabla 1. Características de bacterias ácido lácticas probióticas	18
Tabla 2. Metodologías efectuadas en esta investigación	28
Tabla 3. Diseño estadístico por bloques	29
Tabla 4. Análisis químico proximal de las plantas en estudio	35
Tabla 5. Comparativo de cuentas viables en concentración de jarabe simple al 10 y 15 % a las 48 h de fermentación	36
Tabla 6. Comparativo de resultados con otros autores de las variables respuesta de las fermentaciones con BAL después de 48 h	40
Tabla 7. Porcentaje de supervivencia de las cepas seleccionadas según tolerancia a pH ácido	47
Tabla 8. Análisis microbiológicos efectuados a las bebidas fermentadas después de 48 h de fermentación.....	48
Tabla 9. Efecto del almacenamiento a 4°C en la viabilidad de los cultivos lácticos de la fermentación	49

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Crecimiento bacteriano.	29
Ecuación 2. Acidez titulable.....	31
Ecuación 3. Tolerancia a pH ácido.....	31

RESUMEN

El uso de hierbas aromáticas y medicinales forma parte de la historia y costumbres en México y en el mundo desde tiempos milenario; debido a las cualidades que poseen son empleadas como remedios naturales para combatir una gran cantidad de enfermedades. Entre ellas, es común hallar en nuestro país la hierbabuena (*Mentha piperita*), zacate de limón (*Cymbopogon citratus*), hojas de limón (*Citrus limon*), con propiedades medicinales reconocidas al emplearse para dolores estomacales, para la gripe, bronquitis, tos, cansancio, nervios, diabetes, obesidad, colesterol, entre otros; poseen además propiedades carminativas, antiespasmódicas, antihistamínicas, antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, analgésica, antiséptica, antidepresiva; normalmente se emplean en forma de infusiones. Por otra parte, se sabe que la fermentación acidoláctica representa una alternativa tecnológica y de bajo costo para incrementar la calidad nutricional de los alimentos empleados como sustratos y si se emplean bacterias lácticas probióticas se aportan además efectos benéficos hacia la salud humana. En el presente trabajo de investigación se efectuaron bebidas fermentadas a partir de estas tres hierbas aromáticas-medicinales empleando tres bacterias probióticas: *L. johnsonii*, *L. plantarum* y *L. casei* Shirota. Se evaluó el efecto de incorporar dos niveles de jarabe simple (10 y 15 % V/V) como fuente de carbono sobre cuentas viables después de 48 h de fermentación. En todas las bebidas fermentadas no hubo diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) sobre el crecimiento bacteriano por lo que se seleccionó el nivel de incorporación del 10 %. Las cuentas viables obtenidas oscilaron entre 7-12.8 \log_{10} UFC/ml, superando el mínimo de cuentas viables para ejercer los efectos probióticos (6 \log_{10} UFC/ml), con tasas de crecimiento (μ) entre 0.27 y 5.82; el pH osciló entre 3.1-4.2, el porcentaje de acidez titulable entre 0.42 y 0.72%, ausencia de hongos y levaduras y de coliformes totales. Después de evaluar la sobrevivencia de las bebidas fermentadas durante 4 semanas, se obtuvieron cuentas viables entre 5.77 y 9.21 \log_{10} UFC/ml. Por lo tanto, con cualquiera de las tres hierbas aromáticas-medicinas y con cualquiera de las tres cepas probióticas evaluadas se pueden elaborar bebidas fermentadas con cuentas viables suficientes para ejercer los efectos benéficos hacia la salud, por lo que pueden ser consideradas como alimentos funcionales, además de que se estaría ofreciendo a la población otra alternativa de alimentos fermentados que se caracterizan por ser a base de lácteos.

Palabras clave: hierba buena, zacate de limón, hojas de limón, bacterias probióticas

1 INTRODUCCIÓN

La salud y la alimentación son dos aspectos importantes para el ser humano, en México hay estudios que muestran la relación que existe entre la dieta de las personas con las enfermedades que les afectan como el cáncer, la osteoporosis y la diabetes, que son las principales causas de muerte en el país. Actualmente la industria alimentaria en conjunto con otras disciplinas como la biotecnología, la biología molecular y la nutrición buscan ofrecer a la población estos dos beneficios juntos en un solo producto. Cuyo principal objetivo es proporcionar beneficios sobre algunos procesos fisiológicos del consumidor más allá de su valor nutritivo tradicional.

Los productos adicionados con probióticos son un tipo de alimento funcional que están ampliamente establecidos en el mercado y son aceptados por los consumidores debido a los beneficios, científicamente comprobados, de los probióticos sobre la preservación de la salud y prevención de diversas enfermedades. Los probióticos son microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica a la salud si son consumidos en cantidades apropiadas. Las bifidobacterias y las bacterias acidolácticas son los microorganismos más estudiados y utilizados como probióticos. Entre los muchos beneficios que proporcionan los probióticos podemos mencionar que ayudan en la disminución de la intensidad y la duración de las diarreas; protegen el intestino al competir con las bacterias patógenas por sitios de adhesión en la mucosa intestinal; producen sustancias antibacterianas, estimulan el sistema inmune, regulan la microflora intestinal y ejercen resistencia a infecciones agudas, mejoran el tránsito intestinal y la absorción de minerales (calcio y magnesio), reducen los niveles de colesterol en suero, previenen el estreñimiento y la diarrea causada por la intolerancia a la lactosa, además de propiedades anticancerígenas.

Actualmente en México existe gran diversidad de productos probióticos en el mercado, sin embargo, la gran mayoría están elaborados a base de lácteos y no satisfacen las demandas de algunos grupos de personas como las que son intolerantes a la lactosa o a proteínas de la leche, a personas vegetarianas o a personas que no les agrada consumir lácteos. Por tal motivo se busca obtener bebidas fermentadas con bacterias probióticas hechas a base de hojas de hierbas aromáticas y de propiedades terapéuticas comprobadas, con el fin de ofrecer a la población un producto que ofrezca beneficios adicionales hacia la salud del consumidor. Es bien sabido por todos la importancia de incluir alimentos de origen vegetal en la dieta diaria. Muchas personas no incluyen estos alimentos nutritivos en su alimentación y pueden ser muchas las causas, como la falta de tiempo en una vida tan agitada.

La fermentación es uno de los procesos biotecnológicos que ha sido utilizado desde tiempos muy remotos por diversas culturas como método de conservación y transformación de alimentos obteniendo diferentes sabores, aromas y texturas, además de ser económica y accesible, también se sabe que se pueden incrementar las propiedades nutritivas de los alimentos. En este trabajo se aplicará la fermentación sobre tres diferentes sustratos de origen vegetal con bacterias lácticas probióticas, para obtener bebidas fermentadas, que sin duda puede convertirse en un producto que las personas pueden consumir como complemento de su alimentación diaria

2 ANTECEDENTES

2.1 Alimento funcional

En la actualidad la sociedad ha adquirido una mayor conciencia sobre los efectos negativos en la salud de una mala alimentación y malos hábitos como la falta de ejercicio o el estrés diario, que pueden terminar ocasionando serios problemas de salud como diabetes, obesidad, cáncer, entre otras (Betoret y col. 2011).

Existe un gran interés en la investigación en áreas como la nutrición, la biotecnología y la biología molecular para apoyar a la industria alimentaria en la elaboración de productos que ayuden en la prevención de enfermedades crónicas no transmisibles que se han convertido en el foco de interés de la Salud Pública. Los productos destinados a cumplir este importante objetivo son llamados alimentos funcionales, los cuales buscan ejercer una acción benéfica sobre algunos procesos fisiológicos, manteniendo el estado de salud y bienestar y/o reduciendo el riesgo de padecer una enfermedad. Las empresas que producen alimentos funcionales están creciendo rápidamente (Ashwell, 2004; Araya y Lutz, 2004).

Entre los ingredientes para la elaboración de alimentos funcionales se encuentran los prebióticos, que son aquellos que contienen determinadas sustancias no digeribles o fibra alimentaria; los probióticos, que son cultivos vivos de microorganismos benéficos y los simbióticos que contienen tanto prebióticos como probióticos; además hay alimentos funcionales que contienen sustancias biológicamente activas, como las isoflavonas, ciertos glucosinolatos, componentes fenólicos, los flavonoides, los péptidos bioactivos, u otros antioxidantes (Kitts, 1993; Serra y Palou, 2000).

Los alimentos con probióticos son de suma importancia en la industria alimentaria, específicamente en el sector de alimentos funcionales, sin embargo, los productos con probióticos que se encuentran actualmente disponibles en el mercado son en su gran mayoría lácteos, a pesar del aumento de consumidores intolerantes a la lactosa,

vegetarianos o que simplemente no disfrutaban de tomar leche. Debido a esto en los últimos años se ha incursionado al estudio de otras fuentes no lácteas como frutas, vegetales y cereales para la obtención de productos con probióticos y por ello es necesario para la industria alimentaria explorar nuevos ingredientes y procesos que puedan ser utilizados industrialmente para la elaboración de nuevos alimentos además de benéficos, nutritivos y sabrosos con características sensoriales agradables (Granato y col. 2010).

2.2 Microorganismos probióticos

El término probiótico significa “a favor de la vida” y existen diferentes definiciones del mismo. Según la FAO (2008) son “microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas” (Mollet y Rowland, 2002). Un alimento que contiene microorganismos probióticos es capaz de proteger al individuo de diferentes maneras: 1) compitiendo con microorganismos dañinos por espacio físico y nutrientes; 2) produciendo sustancias antibióticas (bacteriocinas) activas frente a patógenos; 3) estimulando el sistema inmune del intestino y 4) acidificando el colón, lo cual es desfavorable para el crecimiento de organismos patógenos (Roberfroid, 2000).

Uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos es garantizar que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento desde su elaboración, hasta que sean capaces de colonizar el tracto gastrointestinal para que puedan proveer los efectos benéficos en el huésped (Saarela y col. 2000). Por ello los alimentos y productos que los contengan deben tener al menos 1×10^6 UFC/ml de bacterias, manteniéndose en toda la vida útil del producto (Siuta-Cruce, 2001)

La mayoría de los microorganismos probióticos pertenecen al grupo de las bacterias acidolácticas (BAL), las cuales constituyen un grupo extenso de microorganismos anaerobios facultativos, gram positivo, no esporulados, catalasa negativo, inmóviles, de forma bacilar o esférica. Su nombre se deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de la fermentación de carbohidratos, dando lugar a la formación de ácido láctico como principal producto final

(Brizuela y col. 2001). Las BAL juegan un importante papel en los procesos fermentativos y son ampliamente usadas en la industria alimentaria, no solo por su capacidad de preservar los alimentos, sino porque además confieren nuevas texturas, sabores, aromas a los alimentos fermentados, es decir permiten el desarrollo de nuevos productos (Axelsson, 1993). Existen diversos factores que afectan el crecimiento de BAL en un medio de fermentación. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL (Guerra y col. 2001); la mayoría de las especies necesitan aminoácidos y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantoténico, ácido fólico) (Devlieghere y col. 2004; Ekinci y Gurel, 2008). Son quimioorganotróficos y solamente crecen en medios complejos. Carbohidratos que puedan ser fermentados y alcoholes pueden ser empleados como fuente de energía para producir principalmente ácido láctico, a través de la degradación de hexosas a lactato (homofermentativas) y productos adicionales como acetato, etanol, CO₂, formato o succinato (heterofermentativas) (Savadogo y col. 2006).

De acuerdo a Torres (2002), para que una cepa bacteriana sea considerada probiótica debe cumplir las condiciones siguientes:

- Ser integrante normal de la microflora humana.
- Ser resistente a la degradación por jugos gástricos y bilis.
- Ser capaz de unirse al epitelio intestinal.
- Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal, especialmente el colon.
- Que no sea patógena ni toxigénica (GRAS).
- Que tenga efectos favorables comprobados científicamente.

En la flora intestinal o microflora humana, habitan más de 400 especies de bacterias y levaduras de las que apenas se han identificado y estudiado unas pocas de ellas, estos microorganismos pueden ser benéficos para el huésped como los probióticos entre los que

destacan géneros como bifidobacterias, eubacterias, lactobacilos y otros microorganismos perjudiciales para la salud como *Clostridium*, *Shigella* y *Veillonella*. Cada especie está conformada por millones de bacterias alcanzándose la máxima concentración en el colon, por este motivo, el estudio de la flora intestinal está enfocado hacia su desempeño en esta región (Roberfroid, 2001; Esquivel, 2004). Las investigaciones realizadas con microorganismos probióticos han permitido manipular la flora colónica en forma benéfica hacia la salud del hospedero. Las primeras investigaciones para el desarrollo específico de bacterias probióticas se iniciaron en Japón en la década de los treinta del siglo XX, lográndose aislar y reforzar la primera cepa probiótica en el mundo, llamada *L. casei Shirota*, la cual dio origen a la primera leche fermentada con características de producto probiótico (Esquivel, 2004).

En la actualidad existe un gran interés por los productos con probióticos debido a los efectos benéficos que se han reportado. Entre las especies de *Lactobacilos* que más han sido estudiadas científicamente se encuentran *L. Johnsonii*, *L. casei* y *L. plantarum* (Champagne y col. 2005; Torres, 2002).

2.3 Efectos benéficos de los probióticos en la salud

Las BAL son capaces de producir cantidades significativas de sustancias antimicrobianas, como los ácidos grasos de cadenas corta AGCC entre los cuales destacan el ácido láctico y el ácido acético los cuales reducen considerablemente el pH del medio e inhiben o reducen el crecimiento de muchas bacterias, incluyendo a las que ocasionan putrefacción y enfermedades transmitidas por los alimentos (Ray, 1992). Otra sustancia antimicrobiana producida por las BAL es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que usan para protegerse contra la toxicidad del oxígeno; las cantidades formadas varían según la cepa y la concentración celular. También producen dióxido de carbono para generar un ambiente anaeróbico que impida el crecimiento de ciertos microorganismos (Torres, 2002). Otras sustancias antimicrobianas generadas por las BAL son el diacetilo, la reuterina y las bacteriocinas que

promueven la colonización exitosa al mejorar la ventaja competitiva de las bacterias introducidas contra los habitantes normales del tracto gastrointestinal (Daeschel y Penmar, 1992).

Entre los efectos benéficos del consumo de probióticos se encuentran la disminución de la intensidad y la duración de las diarreas; la protección intestinal atribuida a la competencia por sitios de adhesión entre las bacterias benéficas y las patógenas en la mucosa intestinal; la producción de sustancias antibacterianas y disminución del pH por acción de las bacterias probióticas; así como al efecto de estimulación del sistema inmune. Hay que agregar que la competencia por nutrientes también es otro mecanismo mediante el cual las bacterias benéficas limitan la colonización de las patógenas (Esquivel, 2004). Al lograrse un estado de equilibrio en la microflora, también se contribuye a funciones metabólicas tales como la síntesis y absorción de vitaminas, específicamente vitamina K, piridoxina, cianocobalamina, biotina y ácido fólico (Torres, 2002).

La evidencia científica muestra efectos positivos sobre funciones como regulación de la microflora y resistencia a infecciones agudas, mejora el tránsito intestinal, la absorción de minerales (calcio y magnesio), reduce los niveles de colesterol en suero, previene eficazmente el estreñimiento y la diarrea causada por la intolerancia a la lactosa o bacterias patógenas. Un efecto sinérgico de fibra dietética y bacterias acidolácticas para la mejora de la salud intestinal del huésped puede conseguirse proporcionando plantas naturales fermentadas ricas en fibra (Kim y col. 2000; Kaur y col. 2002).

Varios estudios de investigación confirman la capacidad de las bacterias acidolácticas en la prevención del cáncer; los lactobacilos se han asociado periódicamente con actividades anti-cancerígenas, anti-mutagénicas y anti-tumorigénicas. (Fisher y col. 1998).

2.4 Fermentación de alimentos

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos. Tradicionalmente, las fermentaciones de tipo artesanal

son iniciadas de forma natural, sin la utilización de un microorganismo específico, siendo las cepas microbianas mejor adaptadas las que predominan en el cultivo (Crueger y Crueger, 1989).

El valor nutritivo de un alimento en particular depende de su digestibilidad y su contenido de nutrientes esenciales. Tanto la digestibilidad y el contenido de nutrientes se pueden mejorar por fermentación. Durante la fermentación la actividad enzimática del cultivo microbiano puede predigerir los macronutrientes (Kalantzopoulos, 1997). La fermentación puede mejorar la calidad nutricional de los alimentos, aumentando la cantidad y biodisponibilidad de los nutrientes (Svanberg y Lorry, 1997).

Los alimentos fermentados pueden ejercer un impacto sobre algunas enfermedades nutricionales, mejoran el equilibrio o disponibilidad de aminoácidos esenciales, lo cual puede tener un efecto curativo directo. Además las fermentaciones también aumentan el contenido o la disponibilidad de vitaminas como la tiamina, riboflavina, niacina o ácido fólico lo que puede tener profundos efectos directos sobre la salud de los consumidores de este tipo de alimentos (Steinkraus, 1997).

La fermentación puede reducir el contenido de material no digestible en alimentos de origen vegetal, tales como celulosa, hemicelulosa y poligalacturónico y ácidos glucurónico. El desglose de estos compuestos puede conducir a la mejora de la biodisponibilidad de minerales y oligoelementos (Karoviéová y Kohajdová, 2003).

2.5 Alimentos fermentados con probióticos

El éxito de productos alimenticios con bacterias probióticas depende de que éstas puedan resistir las condiciones de estrés tecnológico como son el pH ácido de la fermentación, los procesos de secado con calor para la producción de polvos de fermentación y durante la vida de anaquel y posteriormente a las condiciones de estrés fisiológico, como el pH ácido del estómago y la presencia de las sales biliares. La resistencia del mayor número de células es necesaria para alcanzar su sitio de acción en número

suficiente que les permita ejercer su efecto funcional. (Sánchez y col. 2007; Cotter y Hill, 2003; Fozo y Quivey, 2004).

Para elaborar alimentos fermentados con probióticos es importante considerar que el alimento contenga nutrientes que puedan ser utilizados como sustrato para el crecimiento del microorganismo, pero que al mismo tiempo, carezca de compuestos que puedan inhibir al probiótico o que las cantidades de estas sustancias inhibitorias permitan el crecimiento de los microorganismos a utilizar. Los requerimientos nutricionales son característicos de cada especie, en general para los lactobacilos es deseable que el nitrógeno sea orgánico en forma de aminoácidos o péptidos dentro de los cuales el ácido glutámico, isoleucina y valina son considerados factores de crecimiento y deben estar presentes en el alimento o medio de cultivo (Crueger y Crueger, 1989; Karovicová y Kohajdová, 2003).

Los alimentos lácteos y no lácteos son considerados vehículos para poder introducir bacterias probióticas en el tracto gastrointestinal humano. Se han utilizado alimentos como frutas, verduras, legumbres y cereales para el desarrollo de productos probióticos no lácteos (tabla 6). Los avances tecnológicos han hecho posible la modificación de componentes de los alimentos de una manera controlada, tales como la modificación del pH y la fortificación de medios de cultivo, entre otros (Betoret y col. 2011).

La propuesta de incorporar bacterias probióticas para la elaboración de un alimento fermentado no lácteo usando un sustrato no tradicional implica comprobar la factibilidad del crecimiento de este tipo de bacterias en ese sustrato (Contreras-Pinzón y col. 2007).

Se espera que en el futuro los alimentos funcionales con bacterias probióticas lácticas tengan un mayor consumo y existan variedad de productos disponibles en el mercado; además que haya descubrimiento de nuevas bacterias y por ende nuevos productos biotecnológicos con nuevos hallazgos benéficos nutricionales y terapéuticos que estén disponibles al consumidor desde la infancia hasta la tercera edad (Parra, 2010).

2.6 Fermentación de vegetales con bacterias lácticas probióticas

Young y col. (2006). Investigaron la idoneidad de la col (*Brassica oleracea*) como materia prima para la obtención de un jugo de col fermentado con bacterias lácticas probióticas: *Lactobacilos plantarum* C3, *Lactobacilos casei* A4 y *Lactobacilos delbrueckii* D7. El jugo de col se inoculó con un cultivo láctico de 24 h de edad, y se incubó a 30°C durante 72 h. *L. casei*, *L. delbrueckii* y *L. plantarum*, crecieron bien en el jugo de la col y alcanzaron casi 10×10^8 UFC/ml después de 48 h de fermentación a 30°C. Después de 4 semanas de almacenamiento en frío a 4°C, los recuentos de células viables de *L. plantarum* y *L. delbrueckii* eran 4.1×10^7 y 4.5×10^5 UFC/ml, respectivamente, *L. casei* no sobrevivió al bajo pH y condiciones de alta acidez en el jugo de la col fermentado y perdió por completo la viabilidad celular después de 2 semanas de almacenamiento en frío a 4°C.

González y col. (2008), evaluaron el uso de jugo de sábila (*Aloe vera*) como sustrato principal para fermentaciones con dos bacterias probióticas: *L. plantarum* (NCIMB 11718) y *L. casei* (NRRL-1445). Como resultados obtuvieron altas cuentas viables para ambas cepas: 5.7×10^9 UFC/ml y 6.6×10^{10} UFC/ml para cada cepa respectivamente, utilizaron el jugo de sábila a una concentración del 100%, a las 48 h de fermentación, con un ajuste de pH inicial de 6.5 ± 0.2 , a una temperatura de 30°C y 150 rpm.

Sharma y 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: *L. acidophilus* NCDC 11, *L. plantarum* NCDC 414 y *Pediococcus pentosaceus* MTCC 2819. En sus resultados reportan conteos de células viables de 1×10^7 UFC/ml para las cepas *L. acidophilus* y *P. pentosaceus* y de 1×10^8 UFC/ml para *L. plantarum*. Las fermentaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 30°C y obteniéndose el mayor conteo de bacterias a las 72 h de fermentación. Realizaron también estudios de vida de anaquel obteniendo las siguientes

cuentas viables a las 4 semanas de refrigeración a 4°C: 1×10^7 UFC/ml para *L. plantarum*, 1×10^5 UFC/ml para *L. Acidophilus* y 1×10^4 UFC/ml para *P. pentosaceus*.

Pakbin y col. (2014), evaluaron el uso de jugo de durazno en fermentaciones con 3 cepas de bacterias probióticas: *L. plantarum* DSMZ 20179, *L. delbrueckii* DSMZ 15996, *L. casei* DSMZ 20011. Las fermentaciones fueron realizadas a 30°C durante 72 h, con un cultivo inicial de 1×10^5 UFC/ml de cada cepa y un pH inicial ajustado de 4.4. En sus resultados indican que todas las cepas fueron capaces de crecer y fermentar el jugo de durazno, *L. delbrueckii* obtuvo cuentas viables de 1.12×10^9 UFC/ml después de las 48 h de fermentación a 30°C. Las otras cepas obtuvieron conteos sólo un poco por debajo de *L. delbrueckii*, pero mayores de 1×10^8 . Efectuaron también estudios de vida de anaquel durante 4 semanas a 4°C concluyendo que transcurrido este tiempo *L. delbrueckii* obtuvo 1.7×10^7 UFC/ml, *L. plantarum* 7.2×10^5 UFC/ml y *L. casei* no pudo sobrevivir en el jugo de durazno fermentado almacenado en frío Dimitrovski y col. (2015), evaluaron el uso de jugo de manzana como medio para la fermentación con el probiótico *L. plantarum* PCS 26, realizaron fermentaciones con células libres y embebidas en alginato de calcio a diferentes valores de pH inicial, así como con la administración de suplementos de suero de leche como un promotor de crecimiento. Consiguieron los mejores resultados mediante la fermentación a un pH inicial de 4.2, alcanzando la densidad celular máxima de 2.5×10^9 UFC/ml y un pH final de 4.7 después de 24 h (se esperaba un pH más bajo debido al ácido láctico). Las fermentaciones las llevaron a cabo a 37°C por 48 h a 120 rpm. El jugo de manzana suplementado con 5% v/v de suero de leche aceleró la cinética de fermentación y resultó en un recuento de bacterias superior viable. En contraste, el atrapamiento de células en Ca-alginato causó crecimiento significativamente más lento, produciendo un recuento bacteriano inferior al final de la fermentación (3.2×10^6 UFC/ml). Sin embargo, durante el almacenamiento del producto fermentado a una temperatura entre 4-7 °C y la supervivencia de las bacterias inmovilizadas mejoró, calculado según el modelo Weibullian, aumentó a 32.1 ± 5.2 días en comparación con 22.0 ± 0.68 días.

2.7 Uso de hierbas aromáticas y vegetales en México

El uso de hierbas aromáticas y medicinales ha formado parte de la historia y costumbres en México. Las cualidades especiales de estas plantas como remedio para combatir todo tipo de enfermedades se remonta a tiempos prehispánicos (Masarovičová y Král'ová, 2007). Su aprovechamiento sin duda comenzó con la continua experimentación de materiales vegetales diversos, que de acuerdo a sus características únicas ofrecían agradables aromas, sabores en los alimentos, alivio del dolor y cura de enfermedades (Craker, 2007). Hasta el siglo XIX, las plantas y algunos productos de origen animal y mineral fueron los únicos medicamentos empleados por el hombre en los países occidentales, y siguen siendo hoy en día la única fuente terapéutica utilizada en numerosas zonas rurales del mundo. En la actualidad se están promoviendo proyectos agroindustriales orientados al uso racional de los recursos naturales de flora y fauna para la obtención de productos naturales, desplazando así los productos sintéticos (Masarovičová y Král'ová, 2007). Las hierbas aromáticas y medicinales son buenas alternativas para la elaboración de bebidas con probióticos debido a su amplia distribución y subbeneficios ya conocidos. Estudios reportan que son ricas en minerales, vitaminas, fibras dietéticas, antioxidantes (fitoquímicos) y compuestos fenólicos que son considerados beneficiosos para la salud humana, reduciendo el estrés oxidativo e inhibiendo la oxidación macromolecular. Además, no contienen alérgenos lácteos que pueden impedir el uso de ciertos segmentos de la población (Alvidrez y col. 2002).

Por todo lo anterior, diversos investigadores han estudiado el uso de diferentes tipos de frutas y vegetales para su uso en fermentaciones con bacterias acidolácticas, evaluando las mejores condiciones para obtener productos funcionales que verdaderamente ofrezcan beneficios a la salud del consumidor (Alvidrez y col. 2002).

2.8 Características generales de las plantas empleadas para este estudio

2.8.1 Mentha piperita

Nombres comunes: Hierbabuena de menta, yerbabuena.

Clasificación botánica: Familia labiaceae.

Lugar de origen: Originaria de regiones asiáticas como la antigua Mesopotamia. Se cultiva Alemania así como en Francia, Inglaterra, Rusia, India y Japón (Chessi, 1998).

Descripción botánica: Es una planta herbácea, de color verde muy ramificada con tallos erguidos y pubescentes, hojas opuestas lanceoladas un tanto aserradas tienen la superficie rugosa, son de color verde muy aromáticas (Figura 1) y flores espigadas de color lila-azulado (Fonnegra & Jiménez, 2007). Algunos ejemplares suelen llegar a medir hasta 60 cm de altura, posee un conjunto de rizomas entrelazados subterráneo, toda la planta tiene un olor característico, fuerte y agradable, sabor canforaceo al principio picante después refrescante (Torres, 2013).

Composición química: Las hojas contienen del 10 % al 12 % de elementos minerales como los flavonoides, especialmente los heterósidos derivados de la luteolina y apigenina, ácidos fenólicos, cafeico, clorogénico, ursólico, taninos y un principio amargo, hasta 3 % de aceite esencial (Terán, 2009). El aceite esencial es un líquido incoloro, con olor fuerte y sabor picante, que se halla situado en la superficie superior e inferior de las hojas, los tallos contienen menor proporción del aceite. El principal componente de la esencia es el mentol, que se halla en la proporción de 45 - 70 %, parte de él en estado libre y parte combinado con ésteres, también se han identificado, mentona, acetato de metilo, mentofurano, alfa-pineno, felandreno, cadineno, ácido iso-valeriánico, iso-valerianato de mentilo, pulegona, timol, carvacrol, alcohol amílico, terpineno, alcohol iso-amílico, cincol, etc. (Terán, 2009).

Propiedades físicas y biológicas: Presenta actividad antioxidante por sus compuestos fenólicos y flavonoides. La infusión de hojas secas y la esencia tienen propiedades

carminativas y antiespasmódicas antihistamínicas; también posee actividad antiinflamatoria (Sánchez y col., 1998). En uso externo, en forma de infusión, jarabe, etc., en los trastornos estomacales, espasmos digestivos y abdominales, así como contra insuficiencia biliar. La esencia se utiliza en la industria alimenticia, para realzar sabores en gastronomía, en la preparación de bebidas alcohólicas, en gomas de mascar, así como saborizante de pastas dentales y caramelos (Jima, 2013).



Figura 1. Hojas de hierbabuena (*Mentha piperita*).

2.8.2 *Cymbopogon citratus*

Nombres comunes: Zacate de limón, limoncillo.

Clasificación botánica: Familia Poaceae.

Lugar de origen: Originario de la India, pero actualmente se cultiva comercialmente en China, Madagascar, Islas Comodoro, Brasil, Guatemala, Argentina y Cuba, entre otros (Soto y col., 2002).

Descripción botánica: Es una hierba monocotiledónea, del tipo zacate terrestre alcanzan una longitud de 0,5 a 1.5 m, sus hojas crecen en racimos arrosetadas en la base de la planta, mide entre 1,3 a 2,5 cm de ancho son de color verde brillante lineales, estrechas y rojizas al secarse, flores reunidas en panículas de espiguillas y raramente florece (Shruti y Padma, 2015).

Composición química: Contiene principalmente aceite esencial, del cual se han identificado 37 componentes, lo que representa aproximadamente el 94.5% del total de constituyentes detectados. El aceite contiene una mezcla compleja que consiste principalmente de hidrocarburos monoterpenicos (7.9%), monoterpenos oxigenados (78.2%), hidrocarburos de sesquiterpeno (3.8%) y sesquiterpenos oxigenados (1.6%). La planta presenta otros componentes tales como fibra, carbohidratos solubles, calcio y fosforo (Gbenou y col. 2012).

Propiedades físicas y biológicas: Presenta crecimiento generalizado en climas semitemplados y regiones tropicales es nativo del Sureste Asiático. Es muy usado para infusiones de té no sólo por su agradable sabor, sino por sus propiedades para tratar malestares de gripe, bronquitis, tos y problemas digestivos. El aceite esencial es considerado analgésico, antiséptico, fungicida, antibacteriano y antidepresivo y es usado para revitalizar el cuerpo, despejar la mente y controlar los nervios o cansancio por exceso de trabajo. (Avoseh y col. 2015). Una característica predominante de esta hierba es su fuerte aroma a limón, debido al alto contenido de sus compuestos bioactivos como lemon grass aceite esencial de gran importancia para la industria, ya que grandes cantidades son utilizadas para la extracción del citral, principal constituyente del aceite, el cual es un importante material para la perfumería, confitería, licores, detergentes, etc. y se emplea como materia prima en la síntesis de las iononas, sustancias aromáticas con fuerte olor a violetas y en la síntesis de la vitamina A. (Soto y col. 2002). Dos de las especies principales, *C. flexuosus* y *C. citratus*, son un cultivo de importancia comercial en la República Democrática del Congo (DRC), Madagascar y la Isla Comoras. Sin embargo, el principal exportador de estas plantas es Guatemala, comercializando alrededor de 250.000 kg por año y mientras que la URSS vende alrededor de 70.000 kg por año (Gupta y Jain, 1978). El valor comercial de algunas especies de *Cymbopogon* es aún mayor por su capacidad para crecer en condiciones climáticas moderadas y extremadamente duras (Pareek y Gupta, 1985). En entornos en los que no se

utiliza para la industria, como en la Provincia del Cabo Oriental de Sudáfrica, estas plantas tienen una buena aplicación como pajas de techo y escobas de césped (Nair, 1982).



Figura 2. Zacate de limón (*Cymbopogon citratus*).

2.8.3 Citrus limon

Nombres comunes: planta de limón, árbol de limón.

Clasificación botánica: Familia Rutácea (Lopes y col. 2011).

Lugar de origen: Zona norte y noreste de Brasil (Lopes y col. 2011).

Descripción botánica: Es un arbusto de hojas anchas flores pequeñas de color blanco, sus frutos son ovalados de color verde el tamaño de estos depende de la variedad que sea. Puede llegar a medir hasta 7 metros de altura, crece en climas tropicales templados (Lopes y col. 2011; Campelo y col. 2011).

Propiedades físicas y biológicas: El fruto de la planta de limón es muy conocido, y hasta se sabe algunos beneficios del mismo, las hojas y vástagos de esta planta también son usados como remedio natural por sus propiedad terapéuticas; en diversos países se preparan infusiones a partir de las hojas de limón con la finalidad de tratar obesidad, diabetes, para disminuir niveles de lípido en sangre (colesterol), trastornos cardiovasculares, desórdenes del cerebro y ciertos tipos de cáncer (Campelo y col. 2011). El fruto, las hojas y

vástagos de la planta de limón pueden ser utilizados para crear un té aromático y curativo que mezclado con miel provee muchos beneficios a nuestro cuerpo debido a la gran cantidad de vitaminas, minerales y otros compuestos beneficiosos.








Figura 3. Hojas de limón (*Citrus limon*)

2.8.4 Cepas de bacterias probióticas

Para este trabajo se emplearán las bacterias acidolácticas con características probióticas *Lactobacilos Johnsonii* LC1, *Lactobacilos plantarum* NCIMB 11718, *Lactobacilos casei Shirota*, las cuales deben su gran importancia en la industria alimentaria por la acidificación que producen en el medio debido a la producción de ácido láctico y han sido sometidas a las pruebas bioquímicas que se requieren para certificar la factibilidad del crecimiento de este tipo de microorganismos para brindar los efectos probióticos. En la actualidad estas tres cepas se emplean en la elaboración de alimentos probióticos, que se comercializan en varios países (Kimoto y col. 1999; Park y col. 2002; Gonzáles y col. 2008; Domínguez-Magaña, 2006). En la tabla 1 se mencionan las características de cada una de estas bacterias.

Tabla 1. Características de bacterias ácido lácticas probióticas

Propiedad	<p><i>L. Johnsonii</i></p> 	<p><i>L. plantarum</i></p> 	<p><i>L. casei Shirota</i></p> 
Origen	Humano	Humano	Humano
Seguridad	Verificada	Verificada	Verificada
Estabilidad en ácidos	Buena	Buena	Buena
Estabilidad en sales bil.	Resistente	Resistente	Resistente
Colonización	Sí	Sí	Sí
Prod. de bacteriocinas	Sí	Sí	No
Adherencia en mucosa	Sí	Sí	Sí
Fuente: Salminen y col. (1996)			
<p>Características de las cepas según estudios clínicos comprobados.</p>	<p>Rápida adherencia en células intestinales en humanos.</p> <p>Balance óptimo de la microflora intestinal.</p> <p>Mejoramiento del sistema inmunológico.</p> <p>Eficiente coadyuvante en el tratamiento de disturbios intestinales causadas por <i>Helicobacter pylori</i>.</p> <p>Fuente: Salminen y col. (1998) McFarland (2000) Fondén y col. (2000) Marteau y col. (2001) Pochapin (2000) Mitchetti y col.(1999)</p>	<p>Habilidad para colonizar células intestinales.</p> <p>Balance óptimo de la microflora intestinal.</p> <p>Reducción de niveles de colesterol sérico.</p> <p>Género DSM 9843, adecuado para el tratamiento de pacientes con colon irritable.</p> <p>Fuente: Bukowska y col. (1998) Johansson y col. (1993) Nobaek y col.(2000)</p>	<p>Prevención de disturbios intestinales.</p> <p>Balance óptimo de la microflora intestinal.</p> <p>Reducción de actividades enzimáticas fecales con efectos positivos en la prevención de cáncer de colon.</p> <p>Fuente: Salminen y col.(1996) McFarland (2000) Fondén y col. (2000) Marteau y col. (2001) Pochapin (2000) Ohashi (2000)</p>
<p>Vía de comercialización (producto en el mercado)</p>	<p>Leche fermentada LC1 Nestlé</p> 	<p>Jugo de frutas Proviva</p> 	<p>Leche fermentada Yakult y Sofúl</p> 

3 JUSTIFICACIÓN

Los alimentos con probióticos son un grupo importante de productos generados en la industria alimentaria, debido a todos los beneficios científicamente comprobados que aportan al ser consumidos. Sin embargo, los productos con probióticos que se encuentran disponibles en el mercado son casi exclusivamente a base de lácteos. Recientemente en Europa aparecieron en el mercado bebidas fermentadas a base de frutas. Debido a esto se busca incursionar en el sector probiótico no-lácteo y ampliar el sector de la alimentación funcional, elaborando bebidas a partir de vegetales fermentados con probióticos para obtener nuevos productos de agradable aroma, textura y sabor que ejerzan un impacto positivo en el mantenimiento de la salud o prevención de enfermedades y así dirigir el producto a consumidores intolerantes a la lactosa, vegetarianos o a los que simplemente los lácteos no son de su agrado.

4 HIPÓTESIS

La hierbabuena (*Mentha piperita*), zacate de limón (*Cymbopogon citratus*) y las hojas de limón (*Citrus limon*), pueden ser utilizados como fuentes viables de sustratos para la elaboración de bebidas fermentadas con bacterias lácticas probióticas: *L. plantarum*, *L. Johnsonii* y *L. casei Shirota*.

5 OBJETIVOS

5.1 General

Obtener y caracterizar bebidas fermentadas empleando tres hierbas aromáticas: hierbabuena (*Mentha piperita*), zacate de limón (*Cymbopogon citratus*) y hojas de limón (*Citrus limon*) como sustratos de tres cepas de bacterias acidolácticas probióticas: *L. plantarum*, *L. Johnsonii* y *L. casei Shirota*.

5.2 Particulares

- Evaluar el efecto de incorporar dos niveles de jarabe simple (10 y 15 % p/v) y tres cepas de bacterias lácticas probióticas (*L. Johnsonii*, *L. plantarum* y *L. casei Shirota*) sobre parámetros de fermentación (cuentas viables, tasa de crecimiento, pH y acidez total) a cada uno de los tres sustratos.
- Determinar mediante análisis químicos proximales (AQP) el porcentaje de nutrientes que tiene cada sustrato.
- Determinar la calidad sanitaria a la bebida fermentada mediante análisis microbiológicos: Mesófilos aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales.
- Determinar la estabilidad del producto fermentado, durante 4 semanas en refrigeración (4C), con respecto a la viabilidad de los microorganismos probióticos presentes.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Estrategia experimental

Se efectuaron fermentaciones utilizando bacterias acidolácticas (BAL) con propiedades probióticas comprobadas: *L. plantarum*, *L. Johnsonii* y *L. casei Shirota* sobre tres fuentes vegetales diferentes: hierbabuena (*Mentha piperita*), zacate de limón (*Cymbopogon citratus*) y hojas de limón (*Citrus limon*) con dos niveles de incorporación de jarabe simple (10 y 15%); a condiciones de pH inicial de 6.5 y temperatura de $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se evaluaron: crecimiento de microorganismos (cuentas viables), el pH, y la producción de acidez total titulable durante la fermentación. Posteriormente, se eligió la mejor concentración de jarabe simple para cada cepa de BAL con los mejores resultados en los parámetros de crecimiento. Se realizaron análisis proximales, microbiológicos y viabilidad del producto fermentado. En la figura 4 se esquematiza la metodología general de este trabajo de investigación.

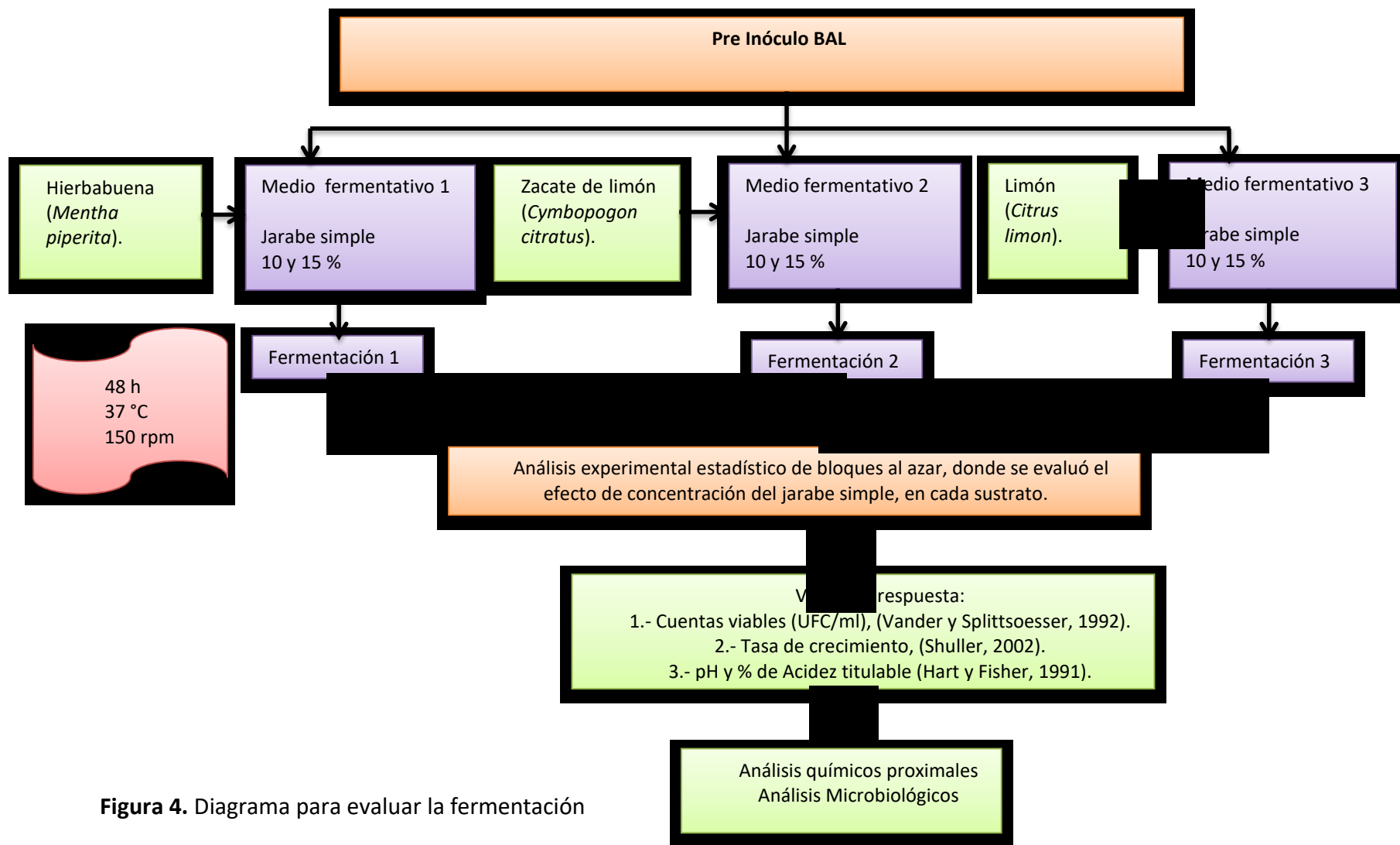


Figura 4. Diagrama para evaluar la fermentación

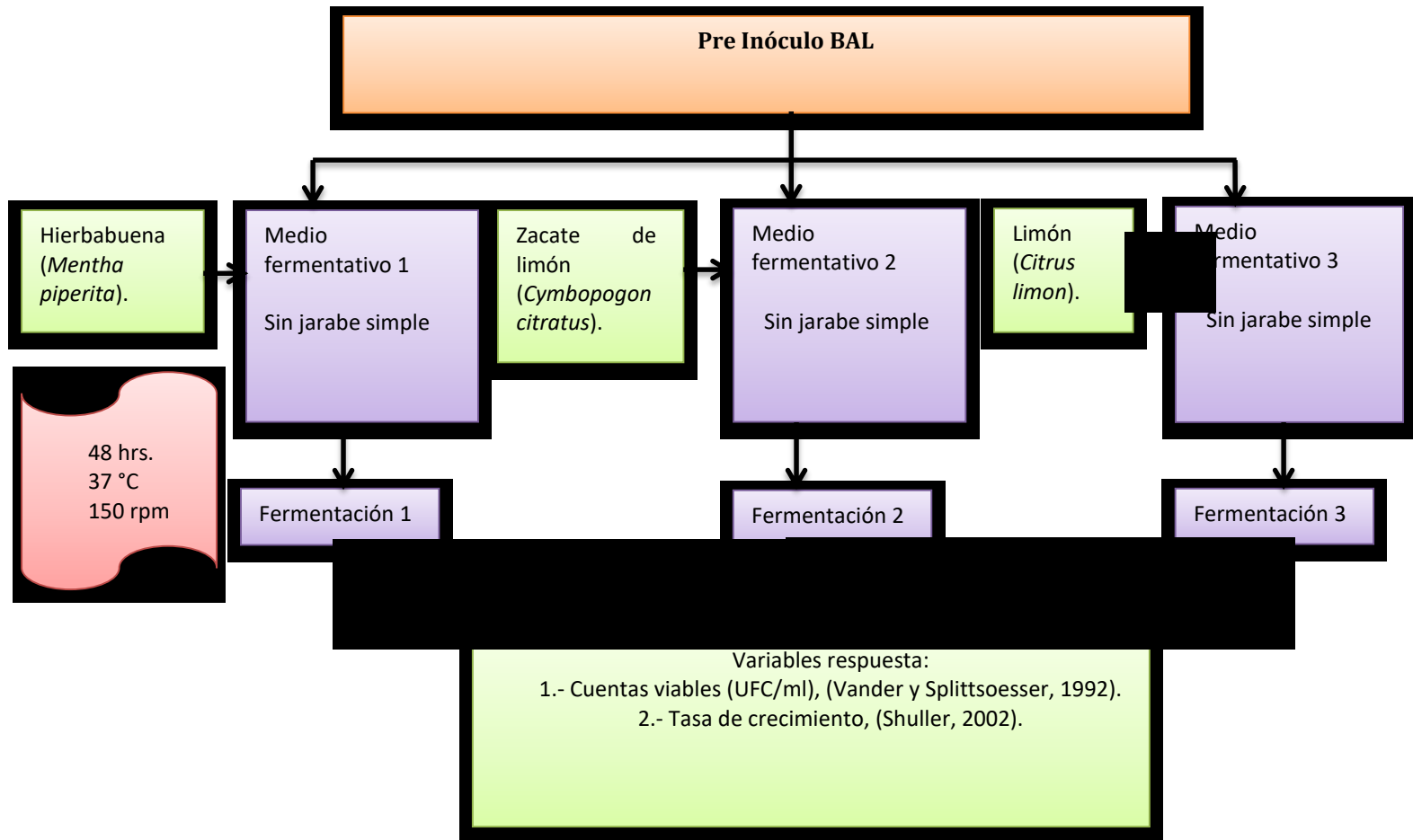


Figura 5. Diagrama para evaluar la fermentación, sin jarabe simple

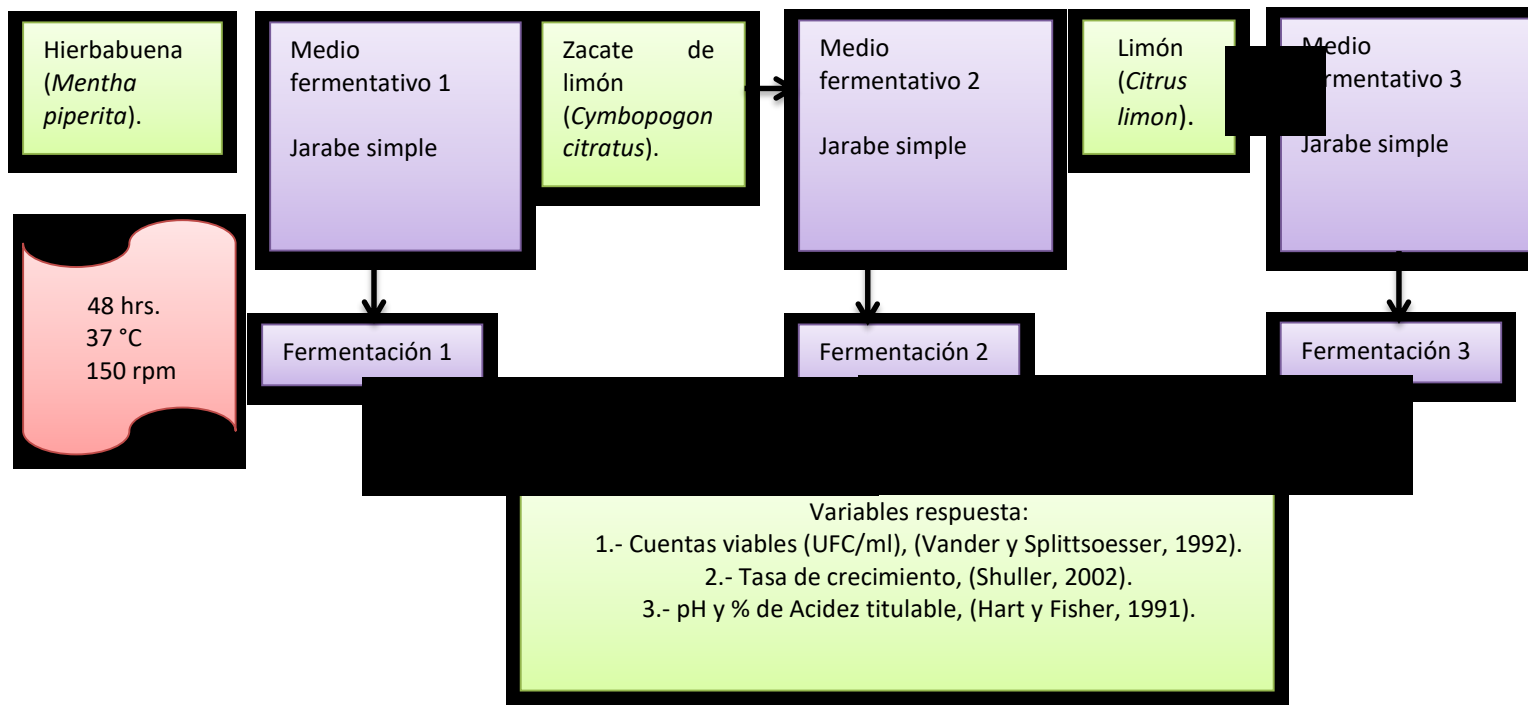


Figura 6. Diagrama para evaluar la fermentación, sin inóculo

6.2 Obtención de las materias primas

6.2.1 Preparación de las formulaciones a partir de hierbas

El material vegetal se recolectó directamente con los productores de la región, para asegurar su frescura. Posteriormente las hojas se lavarón y desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5% V/V.

Los jugos para fermentar fueron obtenidos utilizando una licuadora industrial, se molieron 6 g de hojas (se seleccionaron las mejores), previamente desinfectado en 90 ml de agua purificada y esterilizada, en relación (p/v).

6.2.2 Cepas de BAL empleadas

La cepa de *L. Johnsonii* LC1 fue donada por el Dr. Humberto Hernández de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN; la cepa de *L. plantarum* NCIMB 11718 fue adquirida de colecciones microbianas; la cepa de *L. casei Shirota* fue adquirida de colecciones microbianas del Dr. Mario Alberto Domínguez-Magaña de la Universidad del Papaloapan. Las cepas están conservadas en congelación utilizando glicerol al 20% como crioprotector.

6.3 Análisis proximales de las hierbas

Los componentes proximales se determinaron por los métodos de la AOAC (1984):

- **Humedad:** (Método 925.03), el método se basa en el secado de la muestra en horno (SHEL LAB, USA) a 105° C durante (4 h) hasta peso constante, se utiliza un crisol de porcelana para el manejo de la muestra ambos son pesados por separado, previamente al análisis, el cálculo de humedad es por diferencia de peso de la muestra antes y después de ser secada, la pérdida de peso se toma como porcentaje de humedad.
- **Cenizas:** (Método 923.03), se basa en calcinar la muestra (obtenida del análisis de humedad) en una mufla (Barnstead, USA) a una temperatura que fluctúa

entre 550-600° C durante 4 h, el material que no se volatiliza a esta temperatura se conoce como ceniza, su determinación es por la diferencia de peso del crisol con muestra menos el peso del crisol con residuo inorgánico resultante de la incineración sobre el peso de la muestra original, el resultado se toma como porcentaje de cenizas.

- Grasa cruda o extracto etéreo: (Nielsen, 2003); en este método se extraen lípidos libres, grasas neutras o ácidos grasos libres de modo semicontinuo, con éter de petróleo, en un sistema Soxhlet (Prendo, México), a través de reflujos por 4 h. El contenido de la grasa se mide por la pérdida de peso de la muestra, o bien por el peso de la grasa extraída, después de evaporarse el solvente.
- Proteína cruda: (Nielsen, 2003), Su análisis se efectúa a través de un sistema microKjedahl (Prendo, México) mismo que evalúa el contenido de nitrógeno total en la muestra, después de ser digerida con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador de mercurio. La cantidad de nitrógeno amónico se cuantifica mediante el análisis volumétrico frente a una disolución de HCl 1 N, valorada. Se lleva a cabo el conjunto de análisis sobre una muestra en blanco. El contenido de proteínas se puede calcular, seguidamente, presuponiendo una proporción entre la proteína y el nitrógeno para el alimento que está siendo analizado. Para el ajuste de la técnica se utilizó el factor de 5.7 para proteínas de origen vegetal.
- Fibra cruda: (Método 962.09), Este método permite determinar el contenido de fibra en la muestra, después de ser sometida a una digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en una cámara de digestión (Ankom) y calcinado el residuo. La diferencia de pesos después de la calcinación nos indica la cantidad de fibra presente.
- Determinación cuantitativa de extracto libre de Nitrógeno (E.L.N.): Se utiliza siguiendo el método oficial de la AOAC. Dentro de este concepto se agrupan todos los nutrientes no evaluados con los métodos señalados anteriormente dentro del análisis proximal, constituido principalmente por carbohidratos digeribles, así como también vitaminas y demás compuestos orgánicos solubles no nitrogenados; debido a que se

obtiene como la resultante de restar a 100 los porcentos calculados para cada nutriente. El resultado se calcula de siguiente manera.

Extracto Libre de Nitrogeno (%)= $100 - (\% \text{ proteína cruda} + \% \text{ lípidos crudos} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ humedad} + \% \text{ fibra cruda})$.

6.4 Preparación del inóculo

El cultivo iniciador se preparó 24 h antes de la fermentación, se inocularon 10 ml de caldo MRS previamente esterilizado con 100 μ l de la cepa correspondiente conservada en glicerol empleando de acuerdo a metodología (Domínguez-Magaña, 2006), mismas condiciones de la fermentación para su crecimiento (37°C, 150 rpm). Después de este tiempo, se tomaron alícuotas de 1 ml de caldo MRS con el microorganismo crecido y se colocaron en tubos Ependorff también previamente esterilizados. Los tubos Ependorff se sometieron a centrifugación a 10,000 rpm. Durante 10 minutos a una temperatura de 10 °C. El sobrenadante se retiró y al pellet formado se le agregó 1 ml de solución salina al 0.85% p/v (NaCl) para después, mediante un vortex, reconstituir el pellet en la solución salina. Después se realizó una segunda centrifugación a las mismas condiciones de la primera: 10,000 rpm durante 10 min a 10° C. El sobrenadante se retiró 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 éste inóculo se tomaron 500 μ l por cada 50 ml de sustrato contenido en los matraces de 250 ml.

Se determinó el número de cuentas viables de bacterias acidolácticas en medio MRS, antes y después de inocular mediante conteo en placa (Vander y Splittsoesser, 1992; Man, Rogosa y Sharpe, 1960), los resultados se reportaron en Log_{10} UFC/ml para cada cepa de BAL.

6.5 Metodología de las fermentaciones

Se realizaron fermentaciones inoculando 2000 μ l con cada una de las tres cepas de BAL en el jugo de hierbas previamente esterilizado, empleando dos concentraciones de jarabe simple (10 y 15% v/v) y un tiempo de fermentación de 48 h. Todas las fermentaciones se

realizaron a nivel laboratorio en matraces de 250 ml, con 200 ml de la suspensión de jugo a una temperatura de $37 \pm 2^\circ \text{C}$, una agitación de 150 rpm y con un pH inicial de 6.5 ajustado con HCl 2 N. Después de efectuar el comparativo estadístico sobre el efecto de estos dos niveles de incorporación de jarabe simple (10 y 15%) sobre las cuentas viables (UFC/ml) a las 48 h de fermentación, se seleccionó el nivel de incorporación de jarabe simple con las mayores cuentas viables, repitiendo cada fermentación con su cinética correspondiente. En las fermentaciones posteriores, los parámetros evaluados fueron cuentas viables (UFC/ml), tasa o velocidad de crecimiento (μ), consumo total de azúcares, pH y acidez titulable. Estos parámetros se evaluaron durante cada fermentación en los tiempos: 0, 4, 8, 12, 16, 24, 30 y 48 horas de fermentación, deteniéndose ésta a las 48 h.

A cada bebida fermentada también se les evaluó tolerancia a pH ácido y viabilidad de la bebida durante 4 semanas a 4°C . La determinación de cuentas viables se realizó mediante la técnica de vaciado en placa usando medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS).

En la tabla 2 se indica la metodología empleada durante y después de la fermentación.

Tabla 2. Metodologías efectuadas en esta investigación

Análisis efectuado	Metodología empleada
Cuantificación de células de BAL (UFC/ml)	Vaciado en placa (Vander y Splittsoesser, 1992)
Cálculo de la tasa de crecimiento (μ)	Monod (Shuller, 2002)
Consumo de azúcares totales	Fenol-ácido sulfúrico (Nielsen, 2003)
Medición de pH	Hart y Fisher, (1991)
Medición del % de acidez total	% acidez titulable (Pereira, 1988)
Tolerancia a pH ácido	(Hyronimus y col. 2000; Park y col. 2002)
Calidad sanitaria de la bebida	Análisis microbiológicos (Nielsen, 2003)
Viabilidad de la bebida	Pereira y col. (2010)

6.6 Diseño estadístico a emplear

El diseño estadístico consiste en un diseño de bloques al azar (tabla 3), en el cual los tratamientos a evaluar son los niveles de concentración de jarabe simple en la bebida (10 y 15 % p/v). Cada bloque representa el sustrato a utilizar con cada uno de los tres tipos de cepa. Las variables respuesta son los parámetros de crecimiento a las 48 h de fermentación: cuentas viables (UFC/ml), tasa de crecimiento (μ); cada tratamiento se realiza por triplicado.

Tabla 3. Diseño estadístico por bloques

	Bloque 1			Bloque 2			Bloque 3		
	H	Z	L	H	Z	L	H	Z	L
	<i>L. plantarum</i>			<i>L. Johnsonii</i>			<i>L. casei Shirota</i>		
10%									
15%									

H: Hierbabuena
 Z: Zacate de limón
 L: Hojas de limón

6.7 Cálculo de la tasa de crecimiento bacteriano

Se realizó el cálculo de la tasa de crecimiento de las bacterias en base a lo reportado por Shuller y Kargi, (2002). Mediante la siguiente ecuación:

$$\mu = \ln \frac{X_f}{X_0} \frac{1}{t_f - t_i}$$

Ecuación 1. Crecimiento bacteriano.

Donde:

μ = Velocidad de crecimiento (h^{-1})
 X_f = Concentración celular final expresada en UFC/ml
 X_0 = Concentración celular inicial expresada en UFC/ml
 t_i = Tiempo inicial de crecimiento
 t_f = Tiempo final de crecimiento

6.8 Cuantificación del consumo de azúcares totales

EL consumo azúcares totales durante la fermentación se determino a través de una curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración para la cual se prepararon soluciones de 10-70 mg/L utilizando glucosa como estándar. Como blanco para las lecturas se utilizó agua destilada aplicándole el mismo tratamiento. Para la aplicación del método (Dubois 1956) (Método Fenol-Sulfúrico), se mezclaron 2 ml de muestra con 2 ml de fenol al 5% en tubos digestores y se colocaron en una gradilla sumergida en un baño de agua fría. A los tubos se la añadieron 5 ml de H₂SO₄ se dejaron reposar por 15 min y se analizaron en un espectrofotómetro (marca, país) a una longitud de onda de 490 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado para obtener valores promedios.

6.9 Determinación de pH

Se determinó la variación del pH en el medio de cultivo durante el crecimiento de las bacterias con un potenciómetro (HANNA instruments, Italia), siguiendo el manual de operación del equipo.

Se utilizarón 10 ml de muestra, eliminando los residuos celulares mediante centrifugación a 10,000 x g durante 10 min.

6.10 Determinación del % de acidez titulable

Se determinó la producción de ácidos orgánicos por medio de la acidez titulable durante el crecimiento de las bacterias de acuerdo al método de Pereira (1988); los resultados se expresan como porcentaje de acidez titulable y se calculan de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Acidez titulable (\%)} = \frac{G \times N \times \text{meq} \times 100}{V}$$

Ecuación 2. Acidez titulable

Donde:

G= Gastos de NaOH en la titulación (ml)

N= Normalidad del NaOH usado (0.1 N)

Meq= Miliequivalente de ácido láctico (0.09)

V= Volumen de la muestra (10 ml)

100= Factor para expresar porcentaje

6.11 Tolerancia a pH ácido

Se evaluó la tolerancia a pH ácido (MRS pH: 2,5) y posteriormente se determinó la población sobreviviente. Para la adaptación a las condiciones de acidez se evaluaron las tres cepas de bacterias acidolácticas utilizadas en este estudio *L. Johnsonii*, *L. plantarum*, *L. casei Shirota*. Las bacterias fueron activadas en una primera fermentación de 24 h a 37 °C, llegando a un ph 3-4, dependiendo del tipo de sustrato de la bebida. En la evaluación de la tolerancia de estas cepas se tomaron 50 µl del cultivo y se inocularon en caldo MRS ajustado a pH de 2.5 con HCl 2.2 N se incubó por 3 h a 37 °C (Cueto-Vigil y col. 2010). Para la determinación de las UFC inicial y final se hicieron diluciones en solución salina 0.85% y se inoculan 50 µl de la muestra en placas con agar MRS (por duplicado), las placas se incubaron 24-48 h a 37°C, anaerobiosis. (Hyronimus y col. 2000; Park y col. 2002; Cueto-Vigil y col. 2010)

Los resultados se expresaron en porcentaje de sobrevivencia, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sobrevivencia} = \frac{\text{UFC final (celulas sobrevivientes)}}{\text{UFC inicial}} \times 100$$

Ecuación 3. Tolerancia a pH ácido

6.12 Análisis de la calidad sanitaria de la bebida

6.12.1 Mesófilos aerobios

Para efectuar los análisis microbiológicos se diluyó cada bebida fermentada con una solución diluyente reguladora de fosfatos o con agua peptonada según lo indicado en la NOM 109-SSA1-1994 y la NOM-110-SSA1-1994. Las diluciones seriadas realizadas fueron: 1:1, entre 1×10^{-1} y 1×10^{-7} . En la determinación de bacterias mesofílicas aerobias se utilizó el método de vaciado en placa con agar para método estándar (BIOXON Cat. 134) reportado en la NOM-092-SSA1-1994, inoculando las diluciones entre 1×10^{-1} , y 1×10^{-5} , éstas posteriormente se incubaron a $31 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h. Se contabilizaron las cajas que presentaron entre 25 y 250 unidades formadoras de colonias (UFC), se obtuvieron el promedio de los triplicados tomando en cuenta la dilución a la que se encontraba la muestra y los resultados se reportaron de la siguiente forma: UFC/ml de bacterias mesofílicas aerobias

6.12.2 Coliformes totales

Para el análisis de coliformes totales se siguió la metodología descrita en la NOM-112-SSA1-1994 que es la técnica del NMP (número más probable). Se prepararon diluciones de cada bebida fermentada, desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} y por cada dilución se tomaron 3 tubos conteniendo 10 ml de caldo laurel sulfato triptona (prueba presuntiva) a los cuales se les añadió 1 ml de la muestra diluida, incubando los tubos a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h hasta la formación de gas. De cada tubo positivo que mostro formación de gas, se tomó una asada que se sembró en un tubo con 10 ml de caldo lactosa bilis verde brillante (prueba confirmativa) y se incubó a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. Para reportar los resultados se tomó la serie de tubos de la prueba confirmativa con formación de gas después del periodo de incubación requerido y se buscó el NMP en los cuadros correspondientes.

6.12.3 Coliformes fecales

Para el análisis de coliformes fecales se siguió la metodología descrita por Hitchnins, (1992) y siguiendo la técnica del NMP para coliformes totales, se transfiere una asada de cada tubo de caldo lauril triptona que haya mostrado gas a un tubo con caldo EC y se incuba a $45.5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 h hasta formación de gas. La producción de gas hace positiva esta prueba para coliformes fecales y se realiza el cómputo correspondiente de la misma forma que los coliformes totales.

6.12.4 Hongos y levaduras

Para determinar hongos y levaduras se usaron las diluciones seriales 1:1, de 1×10^{-1} hasta 1×10^{-4} ; el vaciado en placa se hizo con agar dextrosa y papa (BIOXON Cat. 119), acidificado con ácido tartárico al 10% p/v y se incuba a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días. Se contaron las cajas que presentaron entre 10 y 150 UFC, se calculó el promedio de los triplicados tomando en cuenta la dilución de la muestra y los resultados se reportaron de acuerdo a lo reportado en (NOM-111-SSA1-1994; AACC, 1982).

6.13 Análisis de viabilidad durante el almacenamiento de las bebidas fermentadas

Después de las 48 h de fermentación a 37°C , se almacenaron las bebidas fermentadas a una temperatura de 4°C durante 4 semanas, determinando semanalmente la viabilidad del cultivo probiótico en cada bebida, reportando los resultados como unidades formadoras de colonias (\log_{10} UFC/ml), de acuerdo a la metodología de Sharma y Mishra, (2013).

6.14 Análisis estadístico de los datos experimentales

Los datos experimentales que se obtuvieron en este estudio se analizaron estadísticamente mediante un análisis ANOVA para bloques completos aleatorizados (Montgomery, 1998). Para tal fin se utilizó el paquete estadístico computacional Statgraphics Plus versión 5.1.

Los datos obtenidos de los análisis microbiológicos y algunas propiedades nutritivas de las bebidas fermentadas se evaluaron mediante comparación de medias.

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Análisis proximales de las hierbas

En la tabla 4 se presentan los resultados de composición química proximal (AQP) realizados a las hojas de hierba buena, zacate de limón y limón.

El porcentaje de proteína cruda encontrado para hierbabuena (*Mentha piperita*) fue de 4.72 %, para Zacate de limón (*Cymbopogon citratus*) 3.66 % y para hojas de imón (*Citrus limon*) 0.79 % valores similares reportados por Shruti y Padma, (2015). Aunque el porcentaje de proteínas es pequeño es una fuente de nitrógeno orgánico el cual asimilan las BAL para su crecimiento

Antolinez y col. (2008); Sánchez y col. (1998) mencionaron que en vegetales el contenido de nutrientes puede ser variar en concentración, esto puede deberse al lugar de procedencia, condiciones de cultivo, cosecha, así como a los cuidados agronómicos proporcionados a los cultivos por lo cual el porcentaje de los análisis proximales puede variar.

Tabla 4. Análisis químico proximal de las plantas en estudio

Parámetro (%)	Hierbabuena (<i>Mentha piperita</i>)	Zacate de Limón (<i>Cymbopongo citratus</i>)	Hojas de Limón (<i>Citrus limón</i>)
Humedad	81.86 ± 0.2	68.72 ± 0.1	70.02 ± 0.3
Cenizas	1.52 ± 0.2	2.14 ± 0.3	2.44 ± 0.3
Proteína	4.72 ± 0.3	3.66 ± 0.4	0.79 ± 0.2
Grasa	1.58 ± 0.3	5.33 ± 0.2	0.68 ± 0.4
Fibra cruda	12.87 ± 0.1	8.18 ± 0.3	6.80 ± 0.3
E.L.N.	2.13	11.97	18.81

Factor de proteína 5.7

El contenido de elementos libres de nitrógeno ELN se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ E.L.N.} = 100 - (\text{ceniza}\% + \text{humedad}\% + \text{proteínas}\% + \text{lípidos}).$$

El mayor contenido de carbohidratos fue en las hojas de limón 18.81 %, seguida de zacate de limón 11.97 % y por último la hierbabuena con un porcentaje de 2.13 %.

7.2 Cuentas viables (UFC/ml)

El efecto de los dos niveles de jarabe simple (10 y 15 %) en las bebidas fermentadas no fue significativa para el crecimiento de las BAL, por lo cual se tomo la decisión de realizar la formulación de la bebida al 10% de concentración de jarabe simple.

Tabla 5. Comparativo de cuentas viables en concentración de jarabe simple al 10 y 15 % a las 48 h de fermentación

Sustrato/Cepa	Concentración de jarabe simple %	
	10%	15%
	Log ₁₀ UFC/ml	Log ₁₀ UFC/ml
Hierbabuena		
<i>L. casei Shirota</i>	9.3 ^a	9.2 ^a
<i>L. Johnsonii</i>	9.5 ^a	8.92 ^a
<i>L. plantarum</i>	9.4 ^a	9.3 ^a
Zacate de limón		
<i>L. casei Shirota</i>	10.3 ^a	10.1 ^a
<i>L. Johnsonii</i>	9.8 ^a	8.1 ^a
<i>L. plantarum</i>	7.3 ^a	8.1 ^a
Hojas de limón		
<i>L. casei Shirota</i>	8.8 ^a	8.7 ^a
<i>L. Johnsonii</i>	8.3 ^a	8.3 ^a
<i>L. plantarum</i>	12.8 ^a	12.9 ^a

En la tabla 5, se muestran los resultados del crecimiento promedio obtenido en los formulados de las bebidas fermentadas enriquecidos con jarabe simple (sacarosa) al 10% y 15%, para el crecimiento de *L. casei. Shirota*, *L. Johnsonii* y *L. plantarum*. El comportamiento en el crecimiento de las cepas presentaron variación, dependiendo de la cepa y la concentración del sustrato, que van desde (6.1 log₁₀ hasta 12.9 log₁₀) UFC/ml. En los cultivos de *L. casei. Shirota* y *L. Johnsonii* se observó un mayor crecimiento con la bebida de zacate de limón (10.3 Log₁₀ y 9.8 Log₁₀) en la formulación con 10% de jarabe simple, *L. plantarum* presentó menor crecimiento microbiano en este mismo medio y en el de hierbabuena pero presentó mayor crecimiento en la bebida de hojas de limón, donde tuvo una concentración de UFC/ml más alta que las otras dos cepas (12.8 Log₁₀ y 12.9 Log₁₀). Otros autores que tuvieron resultados parecidos son: Young y col. (2005), evaluaron el jugo de betabel como un potencial sustrato para la producción de probióticos con cuatro especies de bacterias acidolácticas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*) con 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 alcanzando cultivos de orden de 10⁹ después de 48 h de fermentación a 30°C (tabla 6). González y col. (2008), utilizaron *Aloe vera* (sábila) como sustrato principal 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) obteniendo crecimientos de (6.6 x 10¹⁰ y 5.7 x 10⁹ UFC/ml para *L.c. Shirota* y *L. plantarum* respectivamente) en un tiempo de fermentación de 48 h a una temperatura de 37 °C.

Young y col. (2006), llevaron a cabo una investigación para determinar la idoneidad del jugo de col sin suplementación de nutrientes, como materia prima para el crecimiento de tres cepas lácticas *L. casei*, *L. plantarum* y *L. delbrueckii*, las cuales crecieron rápidamente alcanzando casi 1 x 10⁸ UFC/ml (tabla 6), después de 48 h de fermentación a 30°C.

Tantipaibulvut y col. (2008), utilizaron para fermentar cepas *L. plantarum* y *L. casei* jugo estéril de roselle (*Hibiscus sabdariffa*) a una temperatura de 30°C durante 72 h, ambas cepas fueron capaces de crecer en jugo alcanzando concentraciones celulares de 8.47 y 8.10 Log₁₀ UFC/ml para *L. plantarum* y *L. casei* respectivamente, encontrando que la

fermentación mas alla de las 24 h dió lugar a una disminución en los recuentos de células viables.

Se piensa que cada cepa encontró disponibilidad de cantidades suficientes de material fermentable en la bebida para crecer y multiplicarse que se reflejó en cuentas viables para las tres cepas con un numero significativo de bacterias ácido lácticas, a pesar de que en este medio se asume, probablemente la existencia de concentraciones de compuestos bacteriostáticos y aunque aparentemente a las 48 h se tiene un mayor crecimiento microbiano, las cepas alcanzan concentraciones de 10^7 de microorganismos viables a las 24 h (figuras 7, 8 y 9), con lo que se podría llevar a cabo en menor tiempo la fermentación con cualquiera de las tres cepas estudiadas.

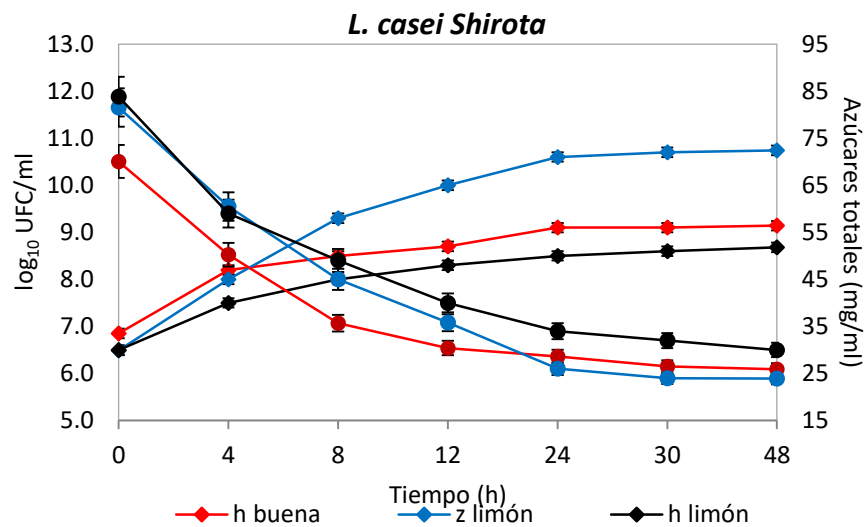


Figura 7. Consumo de azúcares y cuentas viables de BAL de *L. casei Shirota*, obtenido con cada una de las tres hierbas, después de 48 h de fermentación

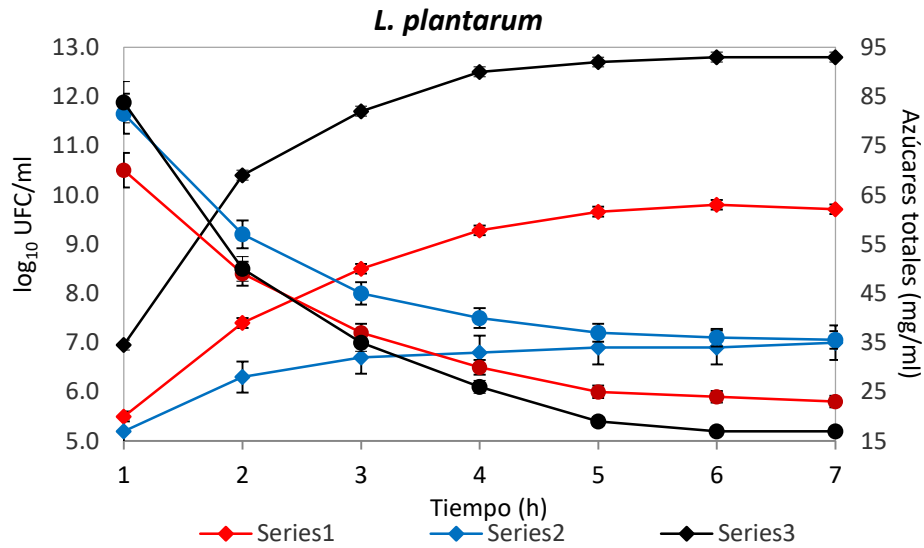


Figura 8. Consumo de azúcares y cuentas viables de BAL de *L. Johnsonii*, obtenido con cada una de las tres hierbas, después de 48 h de fermentación

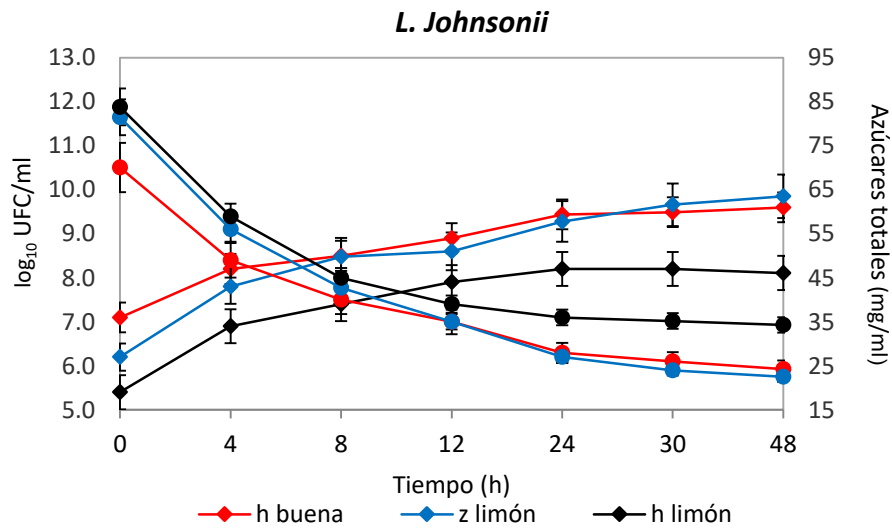


Figura 9. Consumo de azúcares y cuentas viables de BAL de *L. plantarum*, obtenido con cada una de las tres hierbas, después de 48 h de fermentación

La producción de biomasa fue inversamente proporcional al consumo de azúcares lo que quiere decir que el crecimiento coincide con la caída de los azúcares presentes en el medio.

Tabla 6. Comparativo de resultados con otros autores de las variables respuesta de las fermentaciones con BAL despues de 48 h

	Microorganism	Crecimiento celular Log ₁₀ UFC/ml	Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de fermentación (h)	Temperatura (°C)	pH	% A. titulable
Hierba buena	<i>L. c. Shirota</i>	9.1	1.65	48	37	.1	0.72
	<i>L. Johnsonii</i>	9.6	1.88	48	37	.8	0.42
	<i>L. plantarum</i>	9.7	5.82	48	37	.0	0.45
Z. de limón	<i>L. c. Shirota</i>	10.7	5.82	48	37	.6	0.60
	<i>L. Johnsonii</i>	9.9	4.64	48	37	.3	0.64
	<i>L. plantarum</i>	7.0	0.27	48	37	.1	0.85
H. de limón	<i>L. c. Shirota</i>	8.7	1.19	48	37	.6	0.62
	<i>L. Johnsonii</i>	8.1	2.23	48	37	.0	0.53
	<i>L. plantarum</i>	12.8	3	48	37	.1	0.42
Betabel ¹	<i>L. c. Shirota</i>	9.22	1.75	48	30	.0	0.25
	<i>L. plantarum</i>	9.06	0.10	48	30	.1	0.52
	<i>L. acidophilus</i>	9.41	1.26	48	30	.8	0.81
	<i>L. delbrueckii</i>	9.19	2.62	48	30	.5	0.23
Sábila ²	<i>L. c. Shirota</i>	10.81	2.86	48	30	.6	0.7
	<i>L. plantarum</i>	9.75	2.76	48	30	.6	2.0
Col ³	<i>L. c. Shirota</i>	9.07	2.12	48	30	.4	0.6
	<i>L. plantarum</i>	9.18	3.68	48	30	.6	0.76
	<i>L. delbrueckii</i>	9.18	4.31	48	30	.7	0.74
Jamaica ⁴	<i>L. c. Shirota</i>	8.47	0.21	48	30	.8	0.50
	<i>L. plantarum</i>	8.7	1.16	48	30	.8	0.46

¹Young y col. (2005)

²González y col. (2008)

³Young y col. (2006)

⁴Tamtipaibulvu y col. (2008)

7.3 Velocidad de crecimiento μ

En cuanto a la tasa o velocidad de crecimiento (μ), se pudo notar que si hubo diferencia estadística significativa con cada cepa de BAL en relación al sustrato empleado (Figura 10). La tasa más alta se obtuvo en las bebidas de hierbabuena y zacate de limón con las cepas *L. casei Shirota* y *L. plantarum* respectivamente teniendo una μ de $5.82268223 \text{ h}^{-1}$ para ambos. La cepa de *L. Johnsonii* tuvo una tasa de crecimiento entre 1.88 y 4.64 h^{-1} , en tanto que la tasa registrada con la cepa *L. plantarum* osciló entre 0.27 y 5.8 h^{-1} .

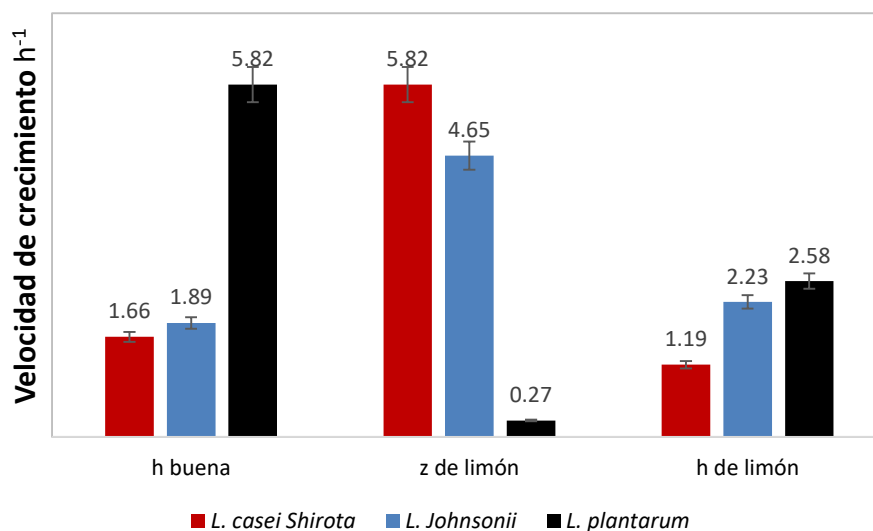


Figura 10. Velocidad de crecimiento

7.4 pH

Se observó la reducción del pH en las formulaciones de las bebidas para todas las cepas evaluadas (Figura 11, 12 y 13), las formulaciones tuvieron un valor inicial de 6.5 alcanzando valores finales de pH de hasta 3.13 con la cepa de *L. plantarum* esto con la bebida de zacate de limón (tabla 6), mientras que en la bebida de hierbabuena y hojas de limón tuvo valores de 4.05 y 4.16 respectivamente, el decremento de pH en los cultivos de *L. plantarum* indica la probable producción de otros ácidos orgánicos como ácido acético (Roberfroid, 2000)

L. casei Shirota y *L. Johnsonii* tuvieron un comportamiento similar en el pH, demostrando que son capaces de fermentar los jugos de zacate de limón y hojas de limón produciendo ácidos grasos de cadena corta y disminuyendo los gradientes de pH (tabla 9).

La cepa de *L. plantarum*, fue la cepa que menor gradiente de pH generó entre las 0 y 4 h de fermentación, en tanto que *L. casei Shirota* y *L. Johnsonii* generaron mayores gradientes en el mismo intervalo de tiempo, en cuanto a la diferencia de temperatura de fermentación con otros trabajos Tantipaibulvut y col. (2008); Narvhus y col. (1998). Probaron dos niveles de temperatura y encontraron que aunque los jugos incubados a 37 °C mostraron una reducción más rápida del pH, después de 18 h de fermentación los jugos incubados a 30 °C mostraron resultados similares en pH, llegando a un valor de pH similar al término de la fermentación.

Las tres cepas *L. plantarum*, *L. casei* y *L. Johnsonii* son capaces de sobrevivir a bajos pH. La importancia de estos valores de pH obtenidos empleando como sustrato hierbas aromáticas, es que se genera un ambiente poco propicio para el desarrollo de microorganismos competidores, incluyendo los patógenos (Shah, 2001).

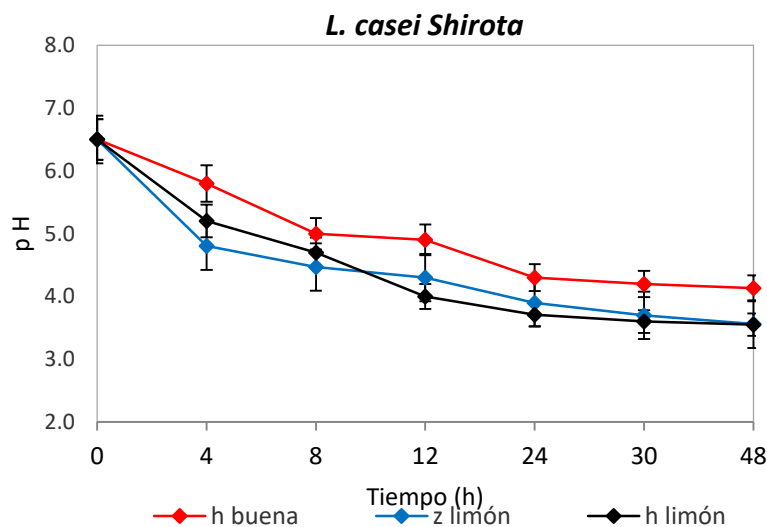


Figura 11. Comportamiento del pH de *L. casei Shirota* después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas

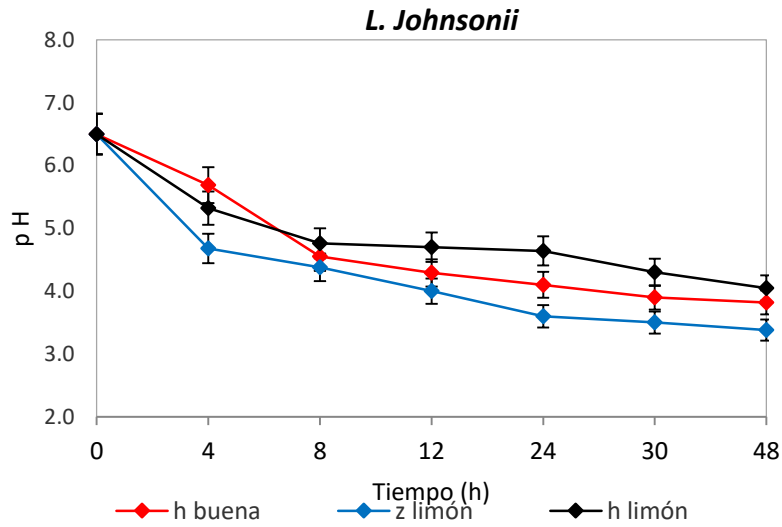


Figura 12. Comportamiento del pH de *L. Johnsonii* después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas

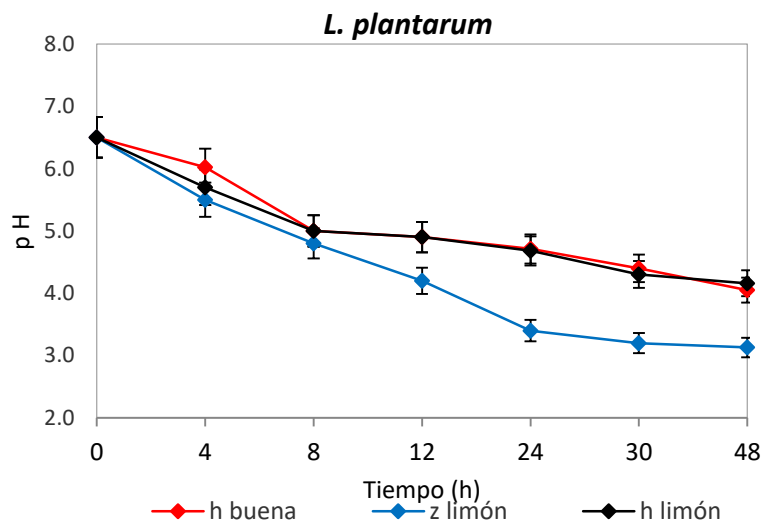


Figura 13. Comportamiento del pH de *L. plantarum* después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas

7.5 % de acidez titulable

Los valores de acidez titulable total obtenidos con las cepas oscilaron entre 0.42 y 0.8 % (Figura 14, 15 y 16, tabla 6). Las cepas *L. Johnsonii* y *L. plantarum* produjeron los menores valores de acidez titulable (0.42 %) expresado como ácido láctico, en las formulaciones con hierba buena y hojas de limón. El mayor valor de acidez (0.85 % \pm 0.05) fue obtenido con la cepa *L. plantarum* en la formulación de zacate de limón; todas las cepas de BAL estudiadas presentaron diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). Las bebidas fermentadas en las que se produjeron la mayor acidez titulable expresada como ácido láctico, fueron las de hierbabuena y zacate de limón (0.72-0.85) respectivamente cada una (tabla 6).

La baja producción de acidez titulable en los jugos de hierbabuena y hojas de limón probablemente se debe a que los microorganismos no encontraron cantidades suficientes de nutrientes para su crecimiento, en los jugos (Pederson y albury, 1969). Otros estudios tienen reportes que sustancias antibacterianas están presentes en jugos a partir de fuentes vegetales esto también puede repercutir en el desarrollo de los microorganismos (Pederson y Fisher 1944; Dickerman y Liberman, 1952).

A pesar de los factores negativos en el medio para las BAL las tres especies de bacterias ácido lácticas *L. casei*, *L. Johnsonii*, *L. plantarum*, se encontraron capaces de crecer en bien en los jugos de las hierbas.

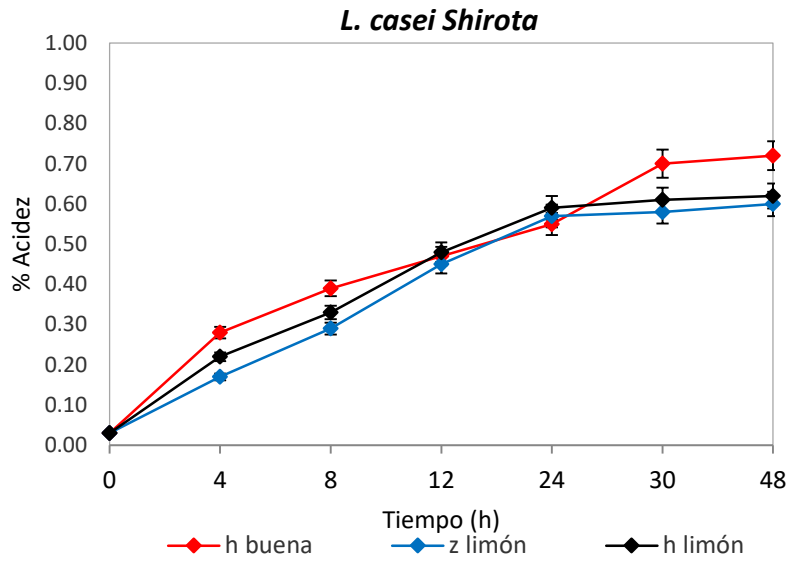


Figura 14. Comportamiento del % acidez de *L. casei Shirota* después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas

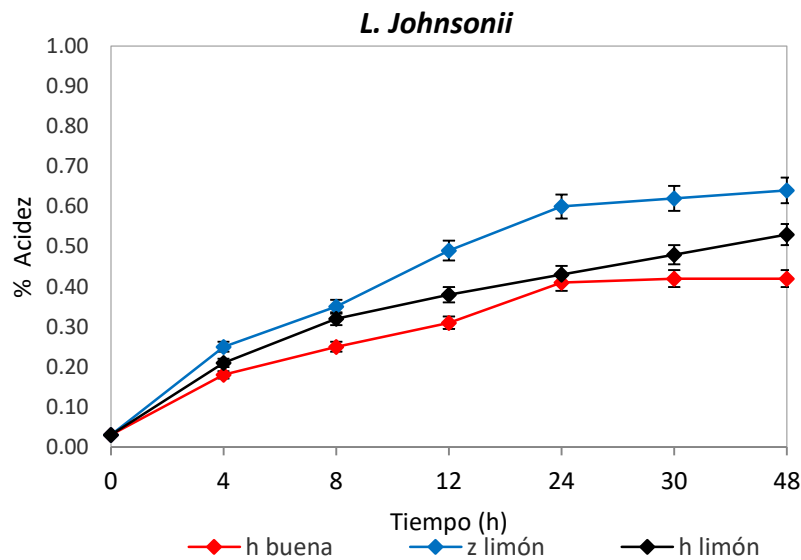


Figura 15. Comportamiento del % acidez de *L. Johnsonii* después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas

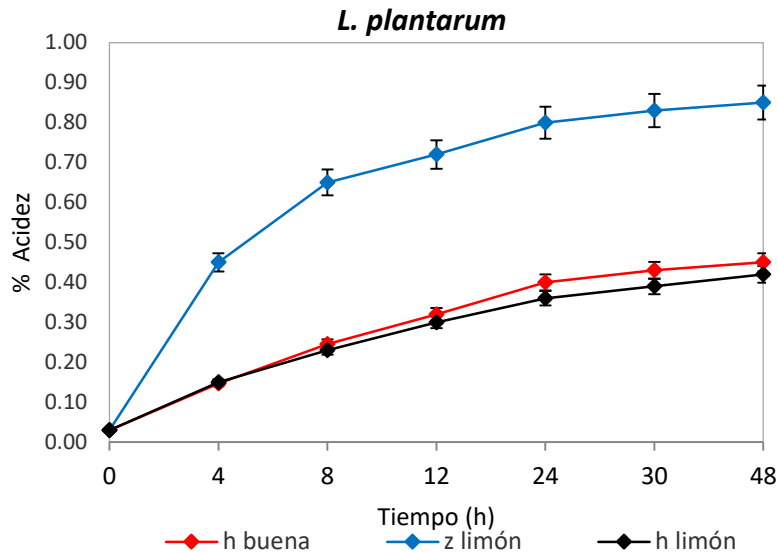


Figura 16. Comportamiento del % de acidez de *L. plantarum* después de 48 h de fermentación con cada una de las tres hierbas

7.6 Crecimiento y tolerancia a pH ácido

Las que presentaron mayor tolerancia a pH ácido fueron *L. plantarum* seguida de *L. casei* y por último de *L. Johnsonii*, esta característica se puede correlacionar con la supervivencia *in vivo* a través del tracto gastrointestinal. En la tabla 7 se observa que la cepa con más porcentaje de supervivencia a pH bajo fue *L. plantarum* presentando un porcentaje de supervivencia de 79 % luego de tres horas de incubación digestivo.

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia de las cepas seleccionadas según tolerancia a pH ácido

Tolerancia a pH bajo (pH: 2,5) UFC/ ml				
Sustrato	Cepas	0 h (Log ₁₀)	3h (Log ₁₀)	% de supervivencia
Hierbabuena	<i>L. casei Shirota</i>	9.6	6.21	64.68
	<i>L. Johnsonii</i>	9.71	7.57	77.96
	<i>L. plantarum</i>	9.71	7.30	75.18
Zacate de limón	<i>L. casei Shirota</i>	10.7	8.37	78.22
	<i>L. Johnsonii</i>	9.9	5.77	58.28
	<i>L. plantarum</i>	8.07	7	86.74
Hojas de limón	<i>L. casei Shirota</i>	8.7	6.72	77.24
	<i>L. Johnsonii</i>	8.1	6.24	77.03
	<i>L. plantarum</i>	12.8	9.82	76.71

7.7 Análisis microbiológicos a las bebidas fermentadas

En relación a la efectividad de los cuidados y condiciones de asepsia que se tuvieron para preparar las bebidas, el tratamiento de desinfección aplicado al material vegetal (hojas) y esterilización del agua, disminuyó el número de microbiota nativa presente en el material vegetal, notándose en los resultados de los análisis microbiológicos efectuados a las bebidas fermentadas, los cuales fueron: BHA bacterias mesófilas aerobias, H y L hongos y levaduras, CT coliformes totales, CF coliformes fecales los valores (tabla 8) los resultados obtenidos de estos análisis están dentro de lo normal, resultando inferiores al recuento de BAL para cada cepa indicando que el procedimiento de sanidad fue efectivo. En relación con el recuento de bacterias lácticas, éstas estuvieron en el orden de 1×10^6 Para los límites de resultados microbiológicos al no haber referencias para este tipo se tomaron las normas del yogur, (Codex A-11(A)/1975; RD 179/2003; BOE 18/02/03). En el mercado cumpliendo con los límites establecidos por la norma respectiva de cultivos vivos para el yogur y para proporcionar los efectos benéficos característicos de probióticos.

Tabla 8. Análisis microbiológicos efectuados a las bebidas fermentadas después de 48 h de fermentación.

		BAL	BMA	H y L	CT	CF
Límite permitido		> 6	< 5	1.0	Ausencia	Ausencia
sustrato	Tipo de Cepa					
Hierbabuena						
	<i>L. casei</i> <i>Shirota</i>	9.1	7.4	ND	ND	ND
	<i>L. Johnsonii</i>	9.6	9.1	ND	ND	ND
	<i>L. plantarum</i>	9.7	7.4	ND	ND	ND
Zacate de limón						
	<i>L. casei</i> <i>Shirota</i>	10.7	8.3	ND	ND	ND
	<i>L. Johnsonii</i>	9.9	7.2	ND	ND	ND
	<i>L. plantarum</i>	7.0	8.7	ND	ND	ND
Hojas de limón						
	<i>L. casei</i> <i>Shirota</i>	8.7	7.1	ND	ND	ND
	<i>L. Johnsonii</i>	8.1	7.6	ND	ND	ND
	<i>L. plantarum</i>	12.8	9.5	ND	ND	ND

ND: no detectado
 BMA: Mesofilos aerobios
 H y L: Hongos y levaduras
 CT: Coliformes totales
 CF: Coliformes fecales
 BAL: Bacterias ácido lácticas

7.8 Viabilidad de la bebida fermentada (4 Semanas)

Para comprobar la viabilidad de las bebidas fermentadas, por 48 h a 37°C, con las tres cepas de bacterias ácido lácticas. En la tabla 9 se ilustra el efecto del almacenamiento en frío a 4°C, tomándose muestras a los 0, 7, 14, 21, hasta cumplir 28 días (4 semanas). Los cultivos de bacterias ácido lácticas redujeron gradualmente su viabilidad en los fermentos, manteniéndose en 5.32-9.21 log₁₀ UFC/ml al final de las 4 semanas (tabla 9), se puede

observar que para los lactobacilos *L. Johnsonii*, *L. casei Shirota* el decenso fue continuo pero sobreviviendo las 4 semanas, en el caso de la bebida con la formulación de zacate de limón presento una reducción significativa de los niveles de *L. plantarum* muriendo el cultivo a la tercer semana. Para que un alimento sea considerado como probióticos debe tener al menos 10^6 UFC/ml (Shah, 2001) y las formulaciones obtenidas tuvieron al menos 10^7 UFC/ml mostrando ser viables en las condiciones evaluadas 4 °C por 4 semanas para el crecimiento de BAL probioticas para beneficos a la salud (Shad, 2001).

La viabilidad de los organismos probióticos puede depender del nivel de oxígeno en los productos, permeabilidad de oxígeno del emvase, tiempo de fermentación y temperatura de almacenamiento. Otros factores para la pérdida de viabilidad de los microorganismos probióticos se han atribuido a la disminución del pH del medio y la acumulación de ácido orgánico como resultado del crecimiento y la fermentación (Obanco y col. 2010).

Tabla 9. Efecto del almacenamiento a 4°C en la viabilidad de los cultivos lacticos de la fermentación

		Viabilidad UFC/ml				
		Tiempo (semanas)				
Sustrato	Microorganismo	0	1	2	3	4
hierbabuena	<i>L. c. Shirota</i>	9.1	8.32	8.13	7.69	7.17
	<i>L. Johnsonii</i>	9.6	8.56	7.88	7.83	7.64
	<i>L. planatrum</i>	9.7	8.7	8.23	8.13	7.79
Zacate de limon	<i>L. c. Shirota</i>	10.7	8.95	8.32	8.27	7.24
	<i>L. Johnsonii</i>	9.9	8.21	7.4	6.18	5.44
	<i>L. plantarum</i>	7.0	6.47	6.21	5.77	----
Hojas de limon	<i>L. c. Shirota</i>	8.7	6.92	6.48	6.10	5.32
	<i>L. Johnsonii</i>	8.1	7.9	7.3	6.9	6.42
	<i>L. planatrum</i>	12.8	11.3	10.75	9.80	9.21

8 CONCLUSIONES

Con la determinación del porcentaje de nutrientes de cada una de las hierbas aromáticas a través de análisis químicos proximales (AQP), se vio que fue necesario el enriquecimiento de los formulados con otra fuente de carbono (jarabe simple) para el crecimiento de los microorganismos.

La evaluación del efecto de la incorporación de los dos niveles de jarabe simple (10 y 15 % p/v) a cada una de las formulaciones con tres cepas de bacterias lácticas probióticas (*L. Johnsonii*, *L. plantarum* y *L. casei Shirota*) no presentó diferencia mínima significativa ($P < 0.05$) sobre parámetros de fermentación (cuentas viables, tasa de crecimiento, pH y acidez total) en cada uno de los tres formulados, por lo cual se utilizó 10% de jarabe simple como nivel de incorporación.

La calidad sanitaria de los fermentos fue aceptable, ya que los resultados de los análisis microbiológicos (mesófilos aerobios, hongos y levaduras, coliformes totales y coliformes fecales) están dentro de los límites permitidos por las Normas Oficiales Mexicanas.

Los microorganismos probióticos son viables y los productos fermentados tienen estabilidad aceptable durante 4 semanas en refrigeración (4°C).

La acidez resultante de cada bebida fermentada, presumiblemente por la presencia de AGCC que se generan durante la fermentación presentó una relación directa con respecto al crecimiento del microorganismo durante su crecimiento y a la disminución del pH.

9 PERSPECTIVAS

Nuevos estudios deben ser llevados a cabo efectuando cultivos mixtos, para producir potenciales bebidas probióticas; esto puede resultar en nuevos productos con la aceptación de la textura y sabor de los productos como son jugos de frutas, vegetales y cereales.

Es preponderante efectuar análisis sensorial a cada bebida fermentada para determinar niveles de aceptación.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Alvidrez, A., Gonzáles, B. E., & Jiménez, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos : alimentos funcionales. *Revista de la Salud Pública y Nutrición*, 3(3), 50-62.
- Antolinez, J. C., Colmenares, N., Usubillaga, A., Darghan, E., & Linares, S. (Septiembre de 2008). Evaluacion de variables agronomicas en el cultivo de limonaria (*Cymbopogon citratus Stapf*) para la produccion de aceite esencial. *Rev. Cienc. Tecn.*, 33(9), 693-699.
- Araya, H., & Lutz, M. (2004). Alimentos funcionales y saludables. *Revista chilena de nutricion*, 1(30), 8-14.
- Ashwell, M. (2004). *Conceptos sobre los alimentos funcionales*. Europa: ILSI International Life Sciences INSTITUTE.
- Association Official Analytical chemists (AOAC). (1984). *Official Methods of Analysis*. 14 th ed ed. VA, USA: Arlington.
- Avoseh, O., Oyedeji, O., Rungqu, P., & Nkeh-Chungag, B. (2015). *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *NCBI*, 20(5), 7438-7453.
- Berner, L., & O'Donnell, J. (1952). Studies on the chemical nature of an antibiotic present in water extract of cabbage. *Food Research*, 17, 438-441.
- Betoret , E., Betoret, N., Vidal, D., & Fito, P. (2011). Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Foods Science & Technology*(22), 498-508.
- Boletín Oficial del Estado (BOE 18-02-2003). No. 42. Norma de Calidad para el yogur. Ministerio de la Presidencia, España:1-18.
- Brizuela, M. A., Guyot, J. P., García-Quitana, N., & López, P. (2001). Physiological and technological evaluation of a lactobacillus strainwith probiotic potentialities. *Revista Cubana de Ciencia Avícola*, 25, 1-9.
- Bukowska, H., Pieczul-Mroz, J., Jastrzebska, M., Cheltowski, K., & Naruszewicz, M. (1998). Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with

- Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. *Atherosclerosis*. 137, 473-8.
- Campelo, L. M., Almeida, A. A., de Freitas, R. L., Cerqueira, G. S., de Sousa, G. F., Saldanha, G. B., . . . de Freitas, R. M. (2011). Antioxidant and antinociceptive effects of *Citrus limon* essential oil in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-2.
- Chessi, E. (1998). *El mundo de las plantas medicinales*. Barcelona: Ultramar Editores.
- Codex Alimentarius (CODEX) A-11(A) (1975). Yoghurt (Yogurt) and Sweetened Yoghurt: 318.
- Contreras-Pinzón, M., Domínguez-Espinosa, R., & González-Burgos, A. (2007). Proceso de biotransformación láctica del jugo de *Aloe vera*. *Revista de Ciencia, Tecnología y Educación*(22), 35-42.
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*(67), 429-453.
- Crueger, W., & Crueger, A. (1989). *Industrial Microbiology Manual*. Acribia España.
- Cueto-Vigil, M. C., Acuna-Monsalve, Y., & Valenzuela-Riano, J. (2010). In vitro evaluation of probiotic potential of lactic bacteria acid isolated from coastal serum. *Actual Biol*, 32(93), 129-138.
- Dickerman, J. M., & Liberman, S. (1952). Studies on the chemical nature of an antibiotic present in water extracts of cabbage. *Journal of Food Science*, 438-441.
- Dimitrovski, D., Velickova, E., Langerholc, T., & Winkelhausen, E. (2015). Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic *Lactobacillus plantarum* PCS 26 strain. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2161-2170.
- Domínguez-Magaña, M. A. (2006). *Fermentación con bacterias lácticas probióticas*. Tesis de Maestría: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Robers, P., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. *Anal. Biochem.* (págs. 350-356).
- F. Pereira, A., C. Maciel, T., & Sueli, R. (2010). Probiotic beverage From cashew apple juice with *Lactobacillus casei*. *Food Research international*, 10(1016), 83.

- FAO. (2008). Production year book. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Vol. 55, Roma).
- Fondén, R., Mogensen, G., Tanaka, R., & Salminen, S. (2000). Culture-containing dairy products-effect on intestinal microflora, human nutrition and health current knowledge and future perspectives. *Bulletin International dairy Foods*, 352.
- Fonnegra, R., & Jiménez, S. L. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.
- Fozo, E. M., & Quivey, R. G. (2004). Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus* mutants enhance survival in acidic environments. *Applied and Environmental Microbiology*(70), 929-936.
- Gbenou, J. D., Ahounou, J. F., Akakpo, H. B., Yayi, E., Gbaguidi, F., Moudachirou, M., Kotchoni, S. O. (2012). Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on wistar rats. *Academic Journal*, 1-8.
- 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 TECNOLOGIA ALIMENTARIA*, 2(6), 152-157.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. (2010). Functional foods and non dairy probiotic food development: trends, concepts and products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.
- Gupta, B., & Jain, N. (1978). Cultivation and utilization of *Genus Cymbopogon* in Indian. *Perfumer India*, 22(2), 55-68.
- Hart, L., & Fisher, H. (1991). Extracto etéreo. En: Análisis Moderno de los Alimentos. 20-21.
- Hart, L., & Fisher, H. (1992). Determinación de pH. En: Análisis Modernos de los Alimentos. 15-17.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., & Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Inf. J. Food Microbiol*(61), 193-197.

- Johansson , M. L., Molin, G., Jeppsson, B., Nobaek, S., Ahrne, S., & Bengmark, S. (1993). Administration of different Lactobacillus strains in fermented oatmeal soup: in vitro colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 15-20.
- Kandyliis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., & Koutinas , A. (2016). Dairy and non-dairy probiotics beverages. *Elsevier*(7), 58-63.
- Karovicova, J., & Kohajdova, Z. (2003). Lactic and fermented vegetable juices. *Horticultura Science*, 30(4), 152-158.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N. M., Ohmomo, S., & Okamoto, T. (1999). Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters of Applied Microbiology*, 29, 313-319.
- Kitts, D. D. (1993). Bioactive substances in food: identification and potential uses. *Canadiense Journal of Physiology Pharmacologia*(72), 423-434.
- Lopes, L. M., C. de Almeida, A. A., Mendes, R. L., Santos, G., Felix, G., Barros, G., Mendes, R. (2011). Antioxidant and Antinociceptive Effects of *Citrus limon* Essential Oil in Mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 8.
- Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.
- Marteau, P., de Vrese, M., Cellier , C., & Schrezenmeir, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 430S-6S.
- Masarovicová, E., & Král'ová, K. (2007). Medicinal plants: Past, Nowadays, Future. *Acta Horticulturae*; 49:19-27.
- McFarland, L. V. (2000). Review of the evidence of health claims for biotherapeutic agents. *Microbiology and Ecology Health Disease*, 12, 65-76.
- Mitchetti, P., Dorta, G., Wiesel, P., Brassart, D., Wedu, E., Herman, M., Blum, A. (1999). Corthesy-Theulan I:Effect of whey based supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*Johnsonii*) Lal on Helicobacter pylori infection in humans. *Digestion*, 60, 203-9.

- Mollet, B., & Rowland, I. (2002). Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5), 483-485.
- Montgomery, D. C. (1998). Diseño y análisis de experimentos. México: Grupo Editorial Iberoamericano. Décima impresión.
- Nair, E. (1982). Promotional aspects of lemon grass. *Cultivation & utilization of aromatic plants regional research laboratory jommu-tawi*, 7, 314-317.
- Narvhus, J., Osteraas, M., & R, T. (1998). Production of fermented milk using a malty compound producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology*, 73-80.
- Nielsen, S. (2003). *Food Analysis Laboratory Manual*. España: ACRIBIA, S.A.
- Nobaek, S., Johansson, M. L., Molin, G., Ahrne, S., & Jeppsson, B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *American Journal of Gastroenterology*, 95, 1231-8.
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa: 12,12,92.
- NOM-109-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Toma, manejo y transporte de muestras: 10,16,95.
- NOM-109-SSA1-1994. Bienestar y Servicios. Toma, manejo y transporte de muestras: 10,16,95.
- NOM-110-SSA-1994. Bienestar y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico: 10,16,95.
- NOM-111-SSA1-1994. Determinación de hongos y levaduras para un alimento: 10,16,95.
- NOM-112-SSA-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.
- Ohashi, Y. (2000). Case Control study for bladder cancer prevention: habitual intake of lactic acid bacteria prevents occurrence of bladder cancer. *Proceedings of 2nd International Congress on Probiotics* . Guadalajara, México.
- Pakbin, B., Razavi, S. H., Mahmoudi, R., & Gajarbeygi, P. (2014). Producing probiotic peach juice. *Biotechnology and health sciences*, 1(3).
- Pareek, S., & Gupta, R. (1985). On the status of agronomic research in *Cymbopogon* grasses in India with projections on the future work. *Journal India*, 215-218.
- Park, Y.-S., Lee, J.-Y., & Shin, D. (2002). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from Dongchimi. *J. Agric. Food Chem*(50), 2531-2536.
- Parra , R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.
- Pederson , C., & Fisher, P. (1944). The bactericidal action of cabbage and other vegetable juices. *State Agricultural Exp. Sta. Bull*, 273.
- Pederson, C., & Albury, M. (1969). The sauerkraut fermentation. *State Agricultural Exp. Sta Bull*, 824.
- Pereira, P. (1988). Acidez como % de ácido láctico en alimentos. Manual de análisis fisicoquímicos. Yucatán, México: Ed. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Pochapin, M. (2000). The effect of probiotics on *Clostridium difficile* diarrhoea. *American Journal of Gastroenterology*, 95, 11S-13S.
- Real Decreto (RD 179/ 2003). Límites microbiológicos para el yogur. Ministerio de la Presidencia, España: 12-39.
- Robertfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: are they functional foods. *The American Journal of clinical nutrition*, 71(6), 1682-1687.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.

- Salminen, S., Bouley, M. C., Boutron-Rualt, M. C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Rowland, I. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Journal of Nutrition*, *1*, S147-S171.
- Salminen, S., Deighton, M. A., Benno, Y., & Gorbach, S. L. (1996). Lactic acid bacteria in health and disease. New York, Marcel Dekker.
- Sánchez, B., Champonier-Verge, M. c., Collado, M., Anglade, P., Baraige, B., Sanz, Y., Zagoreci, M. (2007). Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium Longum* biotype *longum*. *Applied and Environmental Microbiology*(73), 6450-6459.
- Sánchez, E., Leal, M. I., Pino, J., & Carballo, C. (1998). Estandarización de *Mentha spicata* l. medicamento herbario con actividad antiespasmódica. *REV CUBANA PLANT MED*, *3*(1), 26-30.
- Serra, F., & Palou, A. (2000). Perspectivas europeas sobre los alimentos funcionales. *Alimentación, Nutrición y Salud*, *7*(3), 76-90.
- Shah, N. (2001). Functional foods from probiotics and prebiotics. *Food Technology*, *55*(11), 46-53.
- Sharma, V., & Mishra, H. N. (2013). Fermentation of vegetable juice mixture by probiotic lactic acid bacteria. *Nutrafoods*(12), 17-22.
- Shruti, S. R., & Padma, T. (2015). Lemon Grass. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*(30), 162-167.
- Shuller, M., & Kargi, F. (2002). Bioprocess Engineering. Basic concepts. *Prentice may International series in the Physical and Chemical Engineering Sciences* (2a Edition ed., págs. 112-168).
- Siuta-Cruce, P. (2001). Improving probiotics survival rates. *Food technology*, *55*(10), 36-43.
- Soto, R., Vega, g., & Tamajon, A. (2002). Instructivo tecnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf (Cana Santa). *Rev. Cub. Plant. Medic*(7), 1-11.
- Tantipaibulvut, S., Soontornsophan, C., & Luangviphusavanich, S. (2008). Fermentation of roselle juice by lactic acid bacteria. *Food and Agro-Industry*, *1*(04), 213-222.

- Terán, J. (2009). Respuesta del cultivo de menta (*Mentha aquatica*) a la aplicación edáfica de tres fertilizaciones órgano-minerales, a tres dosis. *Universidad Central del Ecuador*.
- Torres, P. A. (2013). Respuesta de la hierba buena (*Mentha piperita L.*) a dos distancias de siembra y a la aplicación adáfica de dos abonos orgánicos más compuestos minerales a tres dosis. tumbaco, pichincha. *Universidad Central del Ecuador*.
- Vander and Splittstoesse, F. (1992). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 94-135.
- Young Yoon, K., E. Woodams, E., & D. Hang, Y. (2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Elsevier*, 97(12), 1427-1430.
- Young Yoon, K., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Elsevier*, 38, 73-75.