



**FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**  
**ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS**

**Elaboración y evaluación de un recubrimiento comestible a base de proteína de suero de leche con *Lactobacillus rhamnosus* y aplicado en chocolates.**

**Trabajo de graduación previo a la obtención de título de:  
Ingeniera en Alimentos**

**Autora**

**Angélica Fernanda Garcés Villacís**

**Directora**

**Ing. María Fernanda Rosales Medina, MSc**

**Co-Director**

**Ing. Jonnatan Fernando Avilés González, PhD**

**Cuenca - Ecuador**

**2018**

## DEDICATORIA

A Dios porque por él estoy aquí y nunca me ha abandonado, ha calmado mis momentos de desesperación y ansiedad, y me ha dado sabiduría para llevar a cabo este trabajo.

A mis abuelos, padres, hermanos, sobrinos y a Jonathan por ser parte fundamental en mi vida y porque son las personas que más han contribuido en toda mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida que tengo.

A mis abuelos, padres, hermanos y sobrinos gracias por todo el cariño, paciencia y apoyo  
brindado.

A Jonathan Blandín gracias por todo el amor, por ayudarme a resolver mis problemas y por  
los consejos durante toda mi trayectoria en la universidad y en la vida diaria.

A Karen Pinos y Cristina Quintero por su amistad incondicional.

A la Ing. María Fernanda Rosales, a los Doctores Jonnatan Avilés, Rodrigo Caroca y  
Cristian Rojas por la asesoría del presente trabajo.

A la Universidad del Azuay por permitirme ser parte de esta institución, a los profesores  
porque gracias a ellos estoy llena de conocimientos y a mis compañeros fue lindo compartir con  
Uds. este largo camino.

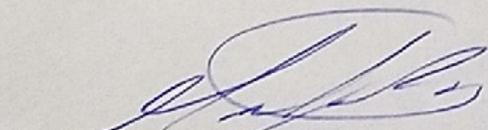
Un agradecimiento especial Al Ing. Diego Montero por su apoyo, ayuda, confianza y amistad.

**ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO  
COMESTIBLE A BASE DE SUERO DE LECHE CON *LACTOBACILLUS  
RHAMNOSUS* Y APLICADO EN CHOCOLATES.**

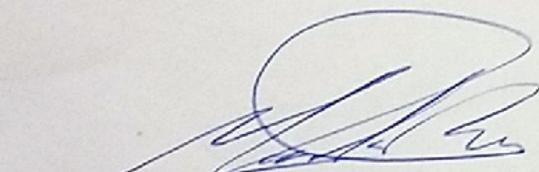
**RESUMEN**

En este trabajo se realizó un estudio exploratorio para obtener la mejor formulación de un recubrimiento comestible adicionado con *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. La mejor formulación fue la que contiene mayor cantidad de inulina, gnetina y probiótico y se lo empleó como recubrimiento en chocolate comercial, sobre el cual se realizaron pruebas de humedad, viabilidad, análisis sensorial y presencia de patógenos. El producto presentó una aceptación sensorial del 86 %, no mostró contaminación microbiana y el *Lactobacillus rhamnosus* se mantuvo viable en cantidades mayores a 6 log UFC/g por un periodo de 25 días.

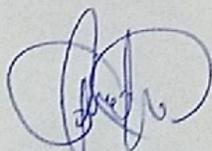
**Palabras claves:** Recubrimiento comestible, *Lactobacillus rhamnosus*, inulina, probiótico.



Ing. María Fernanda Rosales Medina  
Coordinadora de Escuela  
Ingeniería en Alimentos



Ing. María Fernanda Rosales Medina  
Directora del Trabajo de Titulación



Srta. Angélica Fernanda Garcés Villacís  
Autora

## ELABORATION AND EVALUATION OF AN EDIBLE COATING FOR CHOCOLATE BASED ON WHEY WITH LACTOBACILLUS RHAMNOSUS.

### ABSTRACT

This work performed an exploratory study to obtain the best formulation for an edible coating with *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. The best formulation contained the highest amount of inulin, grenetin and probiotic in order to be used as a commercial chocolate coating. The product underwent humidity, viability, sensory analysis and pathogen presence. The study showed a sensory acceptance of 86%. It also revealed no microbial contamination and *Lactobacillus rhamnosus* remained viable in quantities greater than 6 log CFU / g for a period of 25 days.

**Keywords:** Edible coating, *Lactobacillus rhamnosus*, inulin, probiotic.



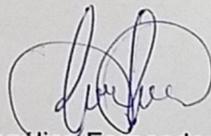
Ing. María Fernanda Rosales Medina

**Food Engineering  
Faculty Coordinator**



Ing. María Fernanda Rosales Medina

**Thesis Director**



Angélica Fernanda Garcés Villacís

**Author**

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>iii</b>
<b>TABLA DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>INDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>4</b>
<b>MATERIALES Y METODOLOGÍA .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Ubicación de la investigación .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Materia prima.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Metodología .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1. Activación y verificación de cepas de microorganismos probióticos. ....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.2. Separación y lavado de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595. ....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.3. Formulación y desarrollo del recubrimiento comestible con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 aplicando diseño estadístico.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.4. Análisis de pH del recubrimiento con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595. ....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.5. Recuento en placa de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 (log UFC/g). ....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.6. Análisis de datos y aplicación de la mejor formulación en el chocolate.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.7. Análisis de humedad del recubrimiento con <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595 aplicado en el chocolate. ....</b>	<b>7</b>

1.3.8. Análisis sensoriales para aceptación del producto.....	8
1.3.9. Estudio de la viabilidad del microorganismo <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y la vida útil del producto.....	8
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>10</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>10</b>
2.1. Activación y verificación de cepas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595. ....	10
2.2. Análisis del estudio exploratorio aplicando diseño factorial 2 <sup>3</sup> . ....	11
2.3. Análisis de humedad del chocolate con el recubrimiento y sin recubrimiento. ....	15
2.4. Análisis sensorial para aceptación del chocolate con el recubrimiento. ....	16
2.5. Viabilidad de microorganismos y vida útil .....	16
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>18</b>
<b>DISCUSIONES</b> .....	<b>18</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>20</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>22</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>27</b>

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1:</b> Componentes específicos de la matriz del recubrimiento comestible. ....	5
<b>Tabla 2:</b> Formulaciones obtenidas a partir del diseño factorial $2^3$ . ....	5
<b>Tabla 3:</b> Escala hedónica de 9 puntos. ....	8
<b>Tabla 4:</b> Respuesta obtenidas de pH y viabilidad bacteriana a los diferentes días de cada experimento. ....	11
<b>Tabla 5:</b> Análisis de varianza de pH a los 10 días. ....	12
<b>Tabla 6:</b> Resumen del modelo para pH a los 10 días. ....	12
<b>Tabla 7:</b> Análisis de varianza de viabilidad bacteriana a los 10 días. ....	13
<b>Tabla 8:</b> Resumen del modelo viabilidad bacteriana a los 10 días. ....	14
<b>Tabla 9:</b> Humedad del chocolate con el recubrimiento a diferentes días. ....	15
<b>Tabla 10:</b> Análisis sensorial de los atributos del chocolate con el recubrimiento comestible. ....	16
<b>Tabla 12:</b> Evaluación sensorial de calidad de los atributos del chocolate con el recubrimiento comestible. ....	17

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Cultivo de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595. ....	10
<b>Figura 2:</b> Fotografía de bacterias tras ser teñidas con la tinción de Gram, obtenida del microscopio. ....	10
<b>Figura 3:</b> Diagrama de Pareto de efectos estandarizados a respuesta de pH a los 10 días. ....	13
<b>Figura 4:</b> Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados de viabilidad bacteriana a los 10 días. ....	14
<b>Figura 5:</b> Gráfica de función de deseabilidad compuesta a respuestas de pH y viabilidad a los 10 días. ....	15
<b>Figura 6:</b> Viabilidad de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595. ....	16

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Ficha de catación .....	27
<b>Anexo 2:</b> Requisitos microbiológicos para chocolates. Norma INEN 0621 .....	27
<b>Anexo 3:</b> Requisitos de humedad en cacao en polvo.....	27
<b>Anexo 4:</b> Cantidad de microorganismos probióticos. ....	28
<b>Anexo 5:</b> Diagrama da Pareto de efectos estandarizados de viabilidad bacteriana a los 10 días. ....	28

Angélica Fernanda Garcés Villacís  
Trabajo de graduación  
María Fernanda Rosales Medina, MSc  
Jonattan Fernando Avilés González, PhD  
Noviembre 2018

## **ELABORACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE A BASE DE SUERO DE LECHE CON *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* Y APLICADO EN CHOCOLATES**

### **INTRODUCCIÓN**

En la actualidad el tema acerca de recubrimientos comestibles o películas comestibles está siendo muy llamativo debido a que son biodegradables, prolongan la vida útil de los alimentos y sirven de vehículo para varios componentes como: sustancias probióticas, prebióticas, antimicrobianos, vitaminas, aditivos, saborizantes, antioxidantes, nutrientes colorantes, entre otros. Al utilizar prebióticos y probióticos en la formulación de una película o recubrimiento se puede considerar al alimento como funcional, siendo esto de gran interés para la población (Lauretin *et al.* 2008, Gutiérrez y Gómez 2007, Durango *et al.* 2011).

Un recubrimiento comestible es una capa delgada y continua que se forma como un revestimiento sobre el alimento, mientras que una película es una capa preformada colocada directamente sobre el alimento. Los recubrimientos y las películas pueden estar formadas de proteínas, polisacáridos, lípidos, o mezclas entre los mismos. Adicional a esto, tanto los recubrimientos como las películas, usan plastificantes, gelificantes u otros componentes que le puedan ayudar en su constitución, siempre y cuando cumplan con cualidades sensoriales, estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana, ser inocuos, no contener contaminantes y no presentar ningún riesgo en la salud del consumidor (Foteini *et al.* 2018, Velázquez y Guerrero 2014, Cerón y Quintero 2010).

Comúnmente los recubrimientos son aplicados en diferentes alimentos, siendo los más usados aquellos perecederos (frutas, verduras, carnes), con la finalidad de alargar su vida útil, generar efecto barrera frente al transporte de gases, evitar la pérdida de humedad y crear una barrera a factores externos. La forma de aplicación en los alimentos puede ser por medio de inmersión o aspersión (Lauretin *et al.* 2008, Velázquez y Guerrero 2014, Cerón y Quintero 2010).

Los recubrimientos y películas comestibles se han clasificado en base al material estructural que las constituyen, por ejemplo, existen hidrocoloides, lipídicos y compuestos de proteínas.

Estas últimas muestran excelentes propiedades mecánicas y estructurales; sin embargo, no ayudan debidamente como barrera de humedad (Cerón y Quintero 2010). La proteína de suero de leche tiene un alto valor nutritivo, presenta propiedades gelificantes, emulsificantes, espesantes y de solubilidad siendo ideales para la formación de los recubrimientos, pero tienen la desventaja de que pueden romperse con facilidad. Las proteínas del suero de leche aisladas o concentradas antes de ser usadas deben ser desnaturalizadas para generar una red tridimensional estable (Huertas 2009).

En la matriz del recubrimiento es necesario usar un plastificante como el glicerol, el mismo que ayuda a disminuir la densidad, la reversibilidad de las interacciones intermoleculares y la flexibilidad del recubrimiento (Barboza 2015, Albizú y Pagan 2011). Tanto los recubrimientos como las películas a base de proteína de suero de leche y glicerol son ideales como barreras del  $O_2$ ,  $CO_2$  y  $C_2H_4$ ; sin embargo, no son barreras al vapor de agua (Galiotta *et al.* 2005).

Uno de los grupos de microorganismos que han mostrado beneficios para la salud sobre todo en el aparato digestivo son las bacterias probióticas, las cuales existen en diferentes cepas como: *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sporogens*, entre otros (Olveira y González 2007).

Diferentes investigaciones han demostrado que las cepas del *Lactobacillus rhamnosus*, tienen muchos beneficios para la salud; entre ellos, prevenir y aliviar diarreas, ayudar en la enfermedad atópica y reducir la inflamación del intestino (Lebeer *et al.* 2009). *L. rhamnosus* son bacterias Gram positivas, anaerobios y que pueden crecer en temperaturas menores a  $15^\circ C$  y a más de  $40^\circ C$ . Necesitan de diferentes vitaminas para su mejor crecimiento, su pH óptimo varía entre 4,5 y 6,4, son muy tolerantes a las condiciones ácidas del estómago y tienen la capacidad de inhibir patógenos (Valik *et al.* 2008).

Por otra parte, los recubrimientos y películas sirven de vehículo de prebióticos de los cuales se ha demostrado que producen efectos beneficiosos sobre el huésped y sirven como medio de crecimiento de bacterias beneficiosas como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*. Además, los prebióticos son ingredientes no digeribles que tienen varias ventajas entre ellas tenemos que ayudan a inhibir y reducir el crecimiento de bacterias patógenas, a regular la microflora, muestran resistencia a infecciones y ayudan a absorber mejor los minerales en el intestino. Existen diferentes tipos de prebióticos, siendo uno de los más usados la inulina, considerada un fructano, no digerible por las enzimas intestinales del ser humano, pero son totalmente fermentadas por la flora intestinal. Además, ayuda a una mejor digestión, controla el colesterol en la sangre, fortalece huesos y reduce la osteoporosis. También se ha descrito que promueve el crecimiento de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Olveira y González 2007, Olagnero *et al.* 2007 y Alarcón 2014).

Cabe mencionar que la combinación de un prebiótico con bacterias probióticas se denomina simbiótico (Cagigas y Blanco 2002).

El uso de recubrimientos o películas comestibles en la actualidad tienen como finalidad obtener otro medio de consumo de ingredientes funcionales como son los prebióticos y los probióticos, y que de esta manera la población no se limite a consumirlos. Además, incentivar el uso de los recubrimientos y películas ayudaría el medioambiente disminuyendo el uso de envases plásticos, vidrio, entre otros. Por último, serviría para aprovechar el uso de desperdicios de diferentes industrias, tales como residuos agrícolas como el bagazo de caña, cáscara de frutas, plumas de animales, cáscara de crustáceos, entre otros (Barboza 2015).

El objetivo principal de este trabajo fue elaborar un recubrimiento comestible a base de proteína de suero de leche, con *Lactobacillus rhamnosus* y evaluar su efecto sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de chocolates. Para ello, se realizó un estudio exploratorio aplicando un diseño factorial  $2^3$  con dos réplicas y dos puntos centrales para obtener la mejor formulación del recubrimiento comestible, considerando sus características fisicoquímicas y microbiológicas. Además, se evaluó la aceptabilidad del producto por medio de un análisis sensorial y se analizó conjuntamente la viabilidad de los microorganismos y vida útil del producto por medio de análisis microbiológicos y análisis sensorial de calidad.

## CAPÍTULO I

### MATERIALES Y METODOLOGÍA

#### 1.1. Ubicación de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Escuela de Ingeniería en Alimentos ubicada en la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

#### 1.2. Materia prima

En la investigación se utilizó: inulina, proteína de suero de leche, grenetina y glicerol, provenientes de la empresa de Centro de Insumos Alimenticios (CIAL). Cepas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, adquiridas de la empresa MEDIBAC y chocolates de la marca Ferrero (Noggy).

#### 1.3. Metodología

El estudio se llevó a cabo en tres etapas, la primera consistió en la activación de las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. En la segunda etapa se realizó el estudio experimental y análisis de datos para obtener la mejor formulación del recubrimiento. Finalmente, en la tercera etapa se aplicó el recubrimiento de mejor formulación en el chocolate. Sobre el producto final se analizó la humedad, aceptación del producto, viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 y la vida útil.

##### 1.3.1. Activación y verificación de cepas de microorganismos probióticos.

Se usaron cepas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 adquiridas de la empresa MEDIBAC. Las cepas fueron activadas en 100 mL de leche en polvo reconstituida al 9 % y enriquecida con tiamina al 0,02 %. Posteriormente, se colocaron en una incubadora a  $37\pm 1$  °C por 72 horas, para ser cultivadas en agar-MRS a pH ajustado entre 4,5 y 5,5 para su mejor crecimiento (Galindo 2016 y Montero 2016).

Por medio de tinción de Gram, método reportado por Santambrosio et al (2009), y con el microscopio de luz LED (Olympus CX22LED, Japón) se verificó la presencia de las bacterias. Finalmente, se colocaron en un criobial (criobank, USA) y fueron refrigeradas a 4 °C para su posterior manejo.

##### 1.3.2. Separación y lavado de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Las bacterias fueron separadas del criobial y sembradas en 100 mL de caldo MRS, luego se

colocaron en una incubadora (Rostfret, Alemania) a  $37\pm 1$  °C por 72 horas bajo condiciones de anaerobiosis. Después de las 72 horas en incubación, se colocó el caldo MRS con las bacterias en tubos estériles (falcón 50 ml) para proceder a centrifugar por 40 minutos con una velocidad de 2500 rpm a 4°C. Continuamente fue lavado con agua peptonada y se volvió a centrifugar por 20 minutos con velocidad de 2500 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado que se obtuvo fue guardado en refrigeración a 4 °C para su posterior manejo.

### 1.3.3. Formulación y desarrollo del recubrimiento comestible con *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 aplicando diseño estadístico.

Para la formulación del recubrimiento comestible se realizó un estudio exploratorio, aplicando un diseño factorial  $2^3$  con dos réplicas y dos puntos centrales. De esta manera, se logró estudiar el efecto de las variables inulina, grenetina y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 (ver tabla 1) y sus respectivas interacciones obteniendo así 18 experimentos. La Tabla 2 expone las formulaciones obtenidas a partir del diseño factorial  $2^3$ , siendo las primeras 16 las formulaciones principales, con sus réplicas (8 formulaciones por duplicado) y las dos últimas representan los puntos centrales.

**Tabla 1:** Componentes específicos de la matriz del recubrimiento comestible.

<b>Componente</b>	<b>%</b>
Inulina	1-2-4
Grenetina	2-3,5-5
Glicerina	6
Proteína de suero de leche	8
Probiótico ( <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 9595)	0,5-0,75-1

La glicerina y la proteína de suero de leche se mantuvieron las mismas porciones en todas las formulaciones, basado en las investigaciones de García *et al.* 2014.

**Tabla 2:** Formulaciones obtenidas a partir del diseño factorial  $2^3$ .

<b>OrdenEst</b>	<b>OrdenCorrida</b>	<b>PtCentral</b>	<b>Bloques</b>	<b>Inulina %</b>	<b>Grenetina %</b>	<b>Probiótico %</b>
1	1	1	1	1	2	0,5
2	2	1	1	4	2	0,5
3	3	1	1	1	5	0,5
4	4	1	1	4	5	0,5
5	5	1	1	1	2	1
6	6	1	1	4	2	1
7	7	1	1	1	5	1
8	8	1	1	4	5	1

9	9	1	1	1	2	0,5
10	10	1	1	4	2	0,5
11	11	1	1	1	5	0,5
12	12	1	1	4	5	0,5
13	13	1	1	1	2	1
14	14	1	1	4	2	1
15	15	1	1	1	5	1
16	16	1	1	4	5	1
17	17	0	1	2,5	3,5	0,75
18	18	0	1	2,5	3,5	0,75

Probiótico: *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Para el desarrollo del recubrimiento comestible se tomó referencia de la técnica de García *et al.* (2014), como se describe a continuación:

El recubrimiento comestible se desarrolló bajo condiciones de esterilidad, para lo cual se utilizó una cámara de flujo laminar (C4 CLASEII TIPOAB3, Colombia), se esterizaron los ingredientes, los materiales y los equipos que se usaron en cada formulación, además se dispuso de guantes, cofia, mascarilla y mandil.

Después de obtener un ambiente inocuo, se procedió al desarrollo del recubrimiento en el cual se usó 100 mL de agua estéril, se colocó en un vaso de precipitación y con una placa calefactora magnética (Barnstead, USA) se elevó la temperatura entre 70-75°C para inmediatamente colocar los componentes. Cada componente se agregó uno por uno, tomando en cuenta el orden de los mismos. Se inició con la grenetina, luego la inulina, el suero de leche y finalmente la glicerina con temperatura estable y manteniendo una agitación constante hasta que cada componente logre su total disolución, para de esta manera obtener la solución formadora del recubrimiento.

Finalmente, se procedió a agregar los *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 previamente obtenidos y una vez que la temperatura de la solución formadora disminuyó alrededor de 30°C, se homogenizó y se colocó en cajas. Se realizaron las lecturas de pH y siembras para determinar la cantidad de microorganismos inicial. Las muestras restantes fueron selladas correctamente para evitar contaminación y refrigeradas para posteriormente realizar pruebas de pH y viabilidad en los días posteriores. Cada experimento se realizó de la misma manera y en las mismas condiciones.

#### **1.3.4. Análisis de pH del recubrimiento con *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.**

Se realizó análisis de pH utilizando un potenciómetro (METTER TOLEDO, Suiza) previamente calibrado con buffer pH 7 y buffer pH 4. Las lecturas se realizaron por triplicado en muestras de 10 mL del recubrimiento. El análisis se realizó a los días de almacenamiento 0, 2 y 10.

#### **1.3.5. Recuento en placa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 (log UFC/g).**

Se preparó agua peptonada y se esterilizó en una autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, en la cámara de flujo laminar, con una balanza (OHAUS, USA), se pesó 10 g de muestra del recubrimiento comestible y se colocó en 90 mL de agua peptonada, se homogenizó y se realizó diluciones seriadas de 1 mL en 9 mL de agua peptonada. De las dos últimas diluciones ( $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ ) se tomó 1 mL y se colocó en cajas Petri estériles con agar-MRS y se dejó reposar. Se colocó en una incubadora a  $37\pm 1$  °C por 72 horas y posteriormente se realizó el conteo en placa. El mismo procedimiento se realizó para cada experimento; al día 0, al día 2 y a los 10 días de elaboración. El análisis se realizó por triplicado (López *et al.* 2014, Ramírez y Castaño 2009).

#### **1.3.6. Análisis de datos y aplicación de la mejor formulación en el chocolate.**

Una vez obtenidas las respuestas de los experimentos, se procedió a insertarlos en el programa de Minitab para obtener la formulación con mejor respuesta a pH y viabilidad a los 10 días de almacenamiento. Se logró buscar la mejor formulación mediante la gráfica de deseabilidad tomando en cuenta el pH y la viabilidad de los microorganismos a los 10 días de elaboración de acuerdo a parámetros que se especificó, en el caso de la viabilidad la meta era maximizar y en el pH fue un objetivo de 5,5.

El recubrimiento fue aplicado en el chocolate en condiciones asépticas por medio de inmersión. Las muestras se mantuvieron dentro de la cámara de flujo laminar hasta lograr la total incorporación del recubrimiento en el chocolate. Las muestras fueron almacenadas por periodos de 4, 7, 11, 14, 17, 21 y 25 días en condiciones del ambiente y en condiciones controladas de humedad y temperatura (65 % y 35 °C, respectivamente).

#### **1.3.7. Análisis de humedad del recubrimiento con *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 aplicado en el chocolate.**

Se realizó pruebas de humedad al chocolate con el recubrimiento. El estudio se llevó a cabo en un periodo de 0, 4, 7, 11, 14, 17, 21 y 25 días de elaboración, utilizando una termo balanza (Sartorius MA35H-115US, Alemania), la misma que obtiene directamente el porcentaje de humedad en 15 minutos. El análisis se efectuó con una cantidad de muestra de alrededor de 4 g y se realizó por triplicado.

### 1.3.8. Análisis sensoriales para aceptación del producto.

El análisis sensorial del chocolate con el recubrimiento se realizó en el laboratorio de biotecnología de la Universidad del Azuay, contando con 25 panelistas tipo consumidor no entrenados y seleccionados al azar (Zuluaga 2017). Se realizó una prueba de aceptación con una escala hedónica de nueve puntos (Tabla 3) (1 me disgusta extremadamente; 9 me gusta extremadamente). Los parámetros a evaluar fueron apariencia, olor, sabor y textura del producto. A cada panelista se le proporcionó un chocolate con un peso de alrededor de 4 g y una boleta para que analice el producto. La encuesta empleada se muestra en el Anexo 1.

**Tabla 3:** Escala hedónica de 9 puntos.

Puntaje	Categoría
9	Me gusta extremadamente.
8	Me gusta mucho.
7	Me gusta moderadamente.
6	Me gusta levemente.
5	No me gusta, ni me disgusta.
4	Me disgusta levemente.
3	Me disgusta moderadamente.
2	Me disgusta mucho.
1	Me disgusta extremadamente.

Obtenida de García *et al.* 2014

### 1.3.9. Estudio de la viabilidad del microorganismo *Lactobacillus rhamnosus* y la vida útil del producto.

La viabilidad de los microorganismos probióticos se evaluó 1, 4, 7, 11, 14, 17, 21 y 25 días después de la elaboración por medio de la técnica de vaciado de placa. Se pesó 10 g de chocolate con el recubrimiento y se colocó en 90 ml de agua peptonada, se homogenizó y posteriormente se realizaron diluciones seriadas de 1 mL en 9 mL de agua peptonada. De las 2 últimas diluciones ( $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ ) se sembró en cajas Petri con agar-MRS, luego se incubaron a  $37 \pm 1$  °C por 72 horas y finalmente se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

El análisis de vida útil se realizó conforme a la viabilidad del *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 en cantidades mayores de 6 UFC/g. La vida útil del producto se realizó por medio de análisis sensoriales de calidad y microbiológicos.

El análisis microbiológico se realizó según lo establecido por la Norma NTE INEN O621

“Chocolates requisitos” (Anexo 2), realizando siembras 1, 4, 7, 11, 14, 17, 21 y 25 días después de la elaboración del producto. El análisis microbiológico de patógenos se llevó a cabo en placas compact dry (Nissui pharm, Japón). Las muestras que se utilizaron permanecieron al ambiente y en una cámara de vida útil en condiciones aceleradas de 35 °C y una humedad de 65 %.

El análisis sensorial de calidad se realizó con 10 jueces semientrenados (Cordero 2014), a quienes se les entregó la boleta usada en los análisis sensoriales para la aceptación del producto, que contenía una escala hedónica de 9 puntos. Las cataciones se llevaron a cabo a 1, 4, 7, 11, 14, 17, 21 y 25 días de elaboración del producto y con muestras almacenadas al ambiente.

## CAPITULO II

### RESULTADOS

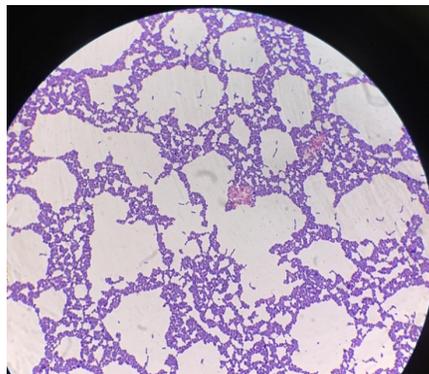
#### 2.1. Activación y verificación de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

La leche reconstituida inoculada con *L. rhamnosus* cuajó al cabo de 72 horas de incubación. Esto es coherente con lo descrito por Jaramillo *et al.* (2010) ya que estas bacterias producen ácido láctico que provoca este efecto en la leche que es inoculada con ellas. Se verificó por medio del cultivo (Figura 1) el crecimiento de las bacterias.

En la Figura 2 indica las bacterias vistas al microscopio tras ser teñidas con la tinción de Gram. De acuerdo a su coloración, forma, estructura y grosor se determinó que las bacterias son bacilos Gram positivos. Las cepas utilizadas no mostraron contaminación de bacterias Gram negativas.



**Figura 1:** Cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.



**Figura 2:** Fotografía de bacterias tras ser teñidas con la tinción de Gram, obtenida del microscopio.

## 2.2. Análisis del estudio exploratorio aplicando diseño factorial 2<sup>3</sup>.

Las respuestas obtenidas de los 8 experimentos con sus réplicas y dos puntos centrales se presentan en la Tabla 4. Los mejores resultados de viabilidad a los 10 días se obtuvieron con el experimento 8 y su réplica 16 como se resalta en la Tabla 4. Estos mostraron una viabilidad bacteriana de 7,606 log UFC/g y 7,648 log UFC/g, respectivamente.

**Tabla 4:** Respuesta obtenidas de pH y viabilidad bacteriana a los diferentes días de cada experimento.

Exp.	pH 0 días	pH 2 días	pH 10 días	Viab. 0 días (log UFC/g)	Viab. 2 días (log UFC/g)	Viab. 10 días (log UFC/g)
1	5,9	5,11	5,28	10,048	9,346	6,588
2	6,8	5,75	5,1	9,852	9,451	6,874
3	6,2	5,78	5,63	9,774	9,117	6,151
4	5,99	5,65	4,8	9,774	9,362	6,827
5	6,06	4,97	4,9	10,76	10,219	7,216
6	6,01	4,8	4,75	10,829	9,959	7,522
7	6,15	5,16	4,88	10,762	10,118	7,362
<b>8</b>	<b>5,97</b>	<b>5,3</b>	<b>5,14</b>	<b>10,958</b>	<b>10,177</b>	<b>7,606</b>
9	6,08	5,34	4,94	10,047	9,338	6,389
10	6,2	5,78	5,55	9,951	9,497	6,239
11	6,1	5,87	5,56	9,652	9,17	6,239
12	6,03	5,73	4,9	9,786	9,317	6,923
13	6,25	5,87	5,57	10,79	9,732	7,161
14	6,16	5,86	5,63	10,907	9,899	7,342
15	6,01	5,18	4,98	10,814	9,712	7,243
<b>16</b>	<b>5,9</b>	<b>5,12</b>	<b>4,96</b>	<b>11,02</b>	<b>10,27</b>	<b>7,648</b>
17	6,2	5,36	4,98	9,803	9,3566	6,573
18	6,1	5,23	4,92	9,943	9,518	6,929

### 2.2.1 Análisis de datos de pH a los 10 días.

Se analizó las variables puras y sus interacciones como muestra la tabla 5. En la que se obtuvo valores de  $p > 0,05$  en todos los casos, lo que indica que no tienen influencia significativa en el modelo. Se obtuvo además un Coeficiente de determinación  $R^2 = 51,54 \%$  el mismo que es considerado bajo en la variabilidad de los datos respuesta (Tabla 6).

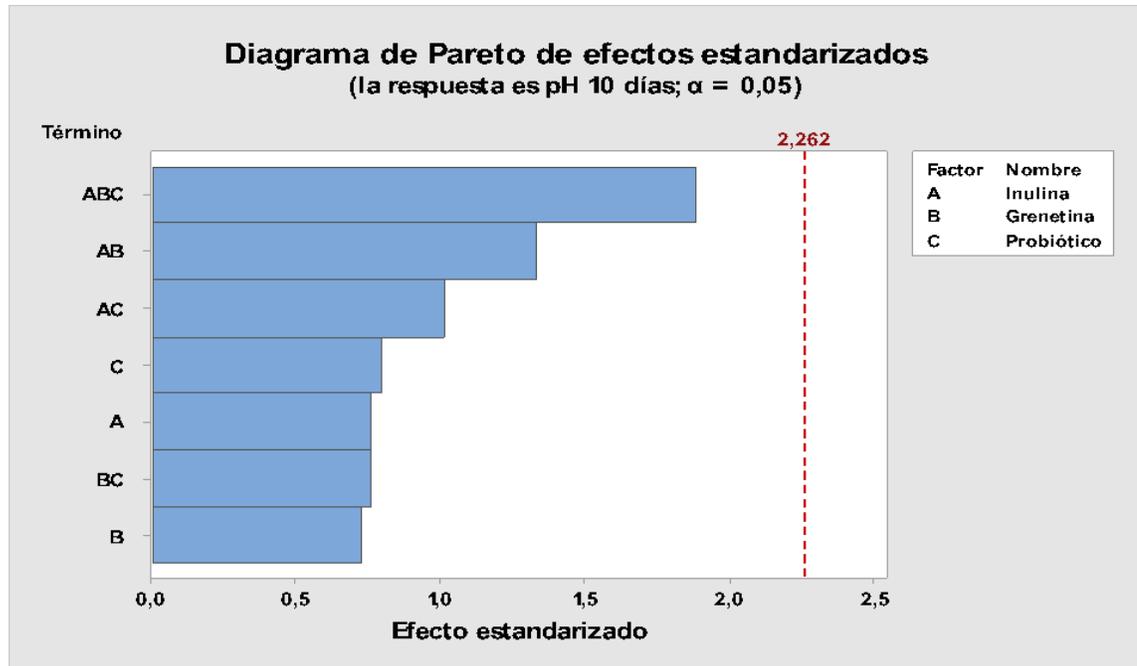
**Tabla 5:** Análisis de varianza de pH a los 10 días.

<b>Fuente</b>	<b>Contribución</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Modelo	51,54%	1,20	0,395
Lineal	9,40%	0,58	0,641
Inulina	3,13%	0,58	0,465
Grenetina	2,86%	0,53	0,485
Probiótico	3,41%	0,63	0,447
Interacciones de 2 términos	18,22%	1,13	0,388
Inulina*Grenetina	9,56%	1,78	0,216
Inulina*Probiótico	5,54%	1,03	0,337
Grenetina*Probiótico	3,13%	0,58	0,465
Interacciones de 3 términos	19,14%	3,55	0,092
Inulina*Grenetina*Probiótico	19,14%	3,55	0,092
Curvatura	4,77%	0,89	0,371
Error	48,46%		
Total	100,00%		

**Tabla 6:** Resumen del modelo para pH a los 10 días.

<b>S</b>	<b>R-cuad.</b>	<b>R-cuad. (ajustado)</b>	<b>PRESS</b>	<b>R-cuad. (pred)</b>
0,298357	51,54%	8,46%	3,2046	0,00%

La Figura 3, muestra la influencia de las variables sobre el pH por medio del diagrama de Pareto de efectos estandarizados, indicando un valor  $T = 2,145$ , el mismo que no traspasa ninguna barra de las variables. Esto quiere decir que no hay influencia de ninguna variable en el modelo, corroborando el análisis de varianza.



**Figura 3:** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados a respuesta de pH a los 10 días.

### 2.2.2 Análisis de datos de Viabilidad bacteriana a los 10 días.

La Tabla 7 indica el análisis de varianza de la viabilidad de los microorganismos a los 10 días, con un Valor  $p < 0,05$  para las variables inulina y probiótico, mientras que la grenetina y las interacciones indicaron un  $p > 0,05$ , dejando de tener influencia significativa en el modelo. Se obtuvo un  $R^2 = 88,93\%$  (Tabla 8), el mismo que es considerado alto en la variabilidad de los datos respuesta.

**Tabla 7:** Análisis de varianza de viabilidad bacteriana a los 10 días.

Fuente	Contribución	Valor F	Valor p
Modelo	85,95%	28,54	0,000
Lineal	84,05%	41,86	0,000
Inulina	10,76%	10,72	0,006
Probiótico	73,29%	73,01	0,000
Curvatura	1,90%	1,89	0,191
Error	14,05%		
Falta de ajuste	6,13%	1,39	0,313
Error puro	7,92%		
Total	100,00%		

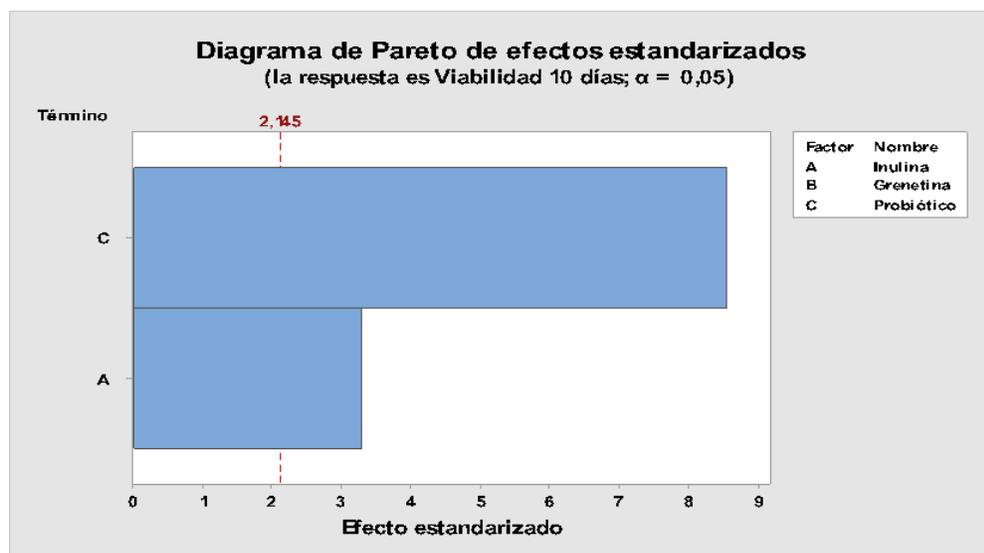
**Tabla 8:** Resumen del modelo viabilidad bacteriana a los 10 días.

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R- cuad.(pred)
0,201005	85,95%	82,93%	0,93	74,80%

La Ecuación (1) de Regresión, indica las unidades codificadas para pH a los 10 días con sus variables significativas.

$$\text{Viabilidad 10 días} = 5,396 + 0,1097 \text{ Inulina} + 1,718 \text{ Probiótico} \quad (\text{Ec. 1})$$

La Figura 4 indica la influencia de las variables por medio del diagrama de Pareto de efectos estandarizados. Con un valor T = 2,160, el mismo que traspasa por la barra del probiótico y de la inulina, indicando que el probiótico, seguido por la inulina, son las variables que afectan significativamente al modelo. Las variables sin influencias significativas se muestran en el Anexo 5.

**Figura 4:** Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados de viabilidad bacteriana a los 10 días.

### 2.2.3 Funciones de deseabilidad para obtención de la mejor formulación.

Las funciones de deseabilidad (Figura 5) reportan que para obtener mayor cantidad de *Lactobacillus rhamnosus* y pH 5,5 en la formulación del recubrimiento, es necesario mayor cantidad de inulina, grenetina y probiótico. La deseabilidad para cada respuesta individual y la deseabilidad compuesta cambian en función de una de las variables (barra roja). La deseabilidad tiene un rango de cero a uno. El número uno representa la situación ideal; cero indica que una o más respuestas están fuera de los límites aceptables (Myers *et al.* 2016).



Figura 5: Gráfica de función de deseabilidad compuesta a respuestas de pH y viabilidad a los 10 días.

### 2.3. Análisis de humedad del chocolate con el recubrimiento y sin recubrimiento.

Se midió la humedad inicial del chocolate sin el recubrimiento y con el recubrimiento, obteniendo valores de 1,67 % y 2,62 %, respectivamente. Adicionalmente, se obtuvo el porcentaje de humedad del chocolate con el recubrimiento a diferentes días, mostrando resultados similares al porcentaje de humedad inicial; sin embargo, hubo una variación en el día 18 (Tabla 9).

Tabla 9: Humedad del chocolate con el recubrimiento a diferentes días.

Días	Humedad (%)
0	2,7 ± 0,146
4	2,23 ± 0,097
7	2,49 ± 0,267
11	2,31 ± 0,074
14	2,21 ± 0,109
18	3,41 ± 0,21
21	2,75 ± 0,125
25	2,66 ± 0,085
28	2,84 ± 0,268
Sin recubrimiento	1,67 ± 0,186

Los datos son media ± desviación estándar de 3 réplicas.

#### 2.4. Análisis sensorial para aceptación del chocolate con el recubrimiento.

La aceptación general del producto fue de 7,76, representando un 86 % de aceptación por parte de los jueces. El factor apariencia obtuvo una valoración de 6,72; siendo el 44 % de los jueces que evaluaron el alimento como “me gusta levemente”, el 40 % indicó “me gusta moderadamente” y el 16 % indicó “me gusta mucho”. El factor olor obtuvo una valoración de 7,48, indicando el 8 % de los jueces que “me gusta levemente”, el 52 % como “me gusta moderadamente”, el 20% como “me gusta mucho” y el 20 % restante de jueces indicó “me gusta extremadamente”. El factor sabor obtuvo una valoración de 8,44, indicando el 4 % de jueces “me gusta moderadamente, el 48% indicó “me gusta mucho” y el otro 48 % evaluó como “me gusta extremadamente”. Por último, se analizó el factor textura, de lo cual se obtuvo una valoración de 8,40, el 8 % de jueces indicó “me gusta moderadamente”, el 40 % como “me gusta mucho” y el 52 % indicó “me gusta extremadamente”. La tabla 10 muestra la valoración de cada atributo.

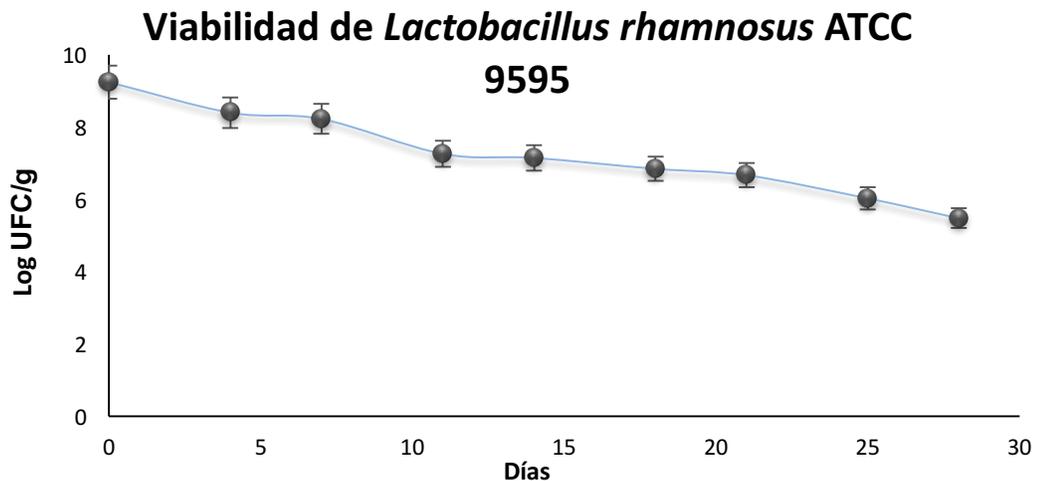
**Tabla 10:** Análisis sensorial de los atributos del chocolate con el recubrimiento comestible.

Muestra	Apariencia	Olor	Sabor	Textura
1	6,72± 0,737	7,48 ± 0,872	8,44± 0,583	8,4± 0,645

Los datos son media ± desviación estándar de 25 jueces no entrenados.

#### 2.5. Viabilidad de microorganismos y vida útil

A los 28 días la viabilidad inicial de 9,247 log UFC/g bajó a 5,479 log UFC/g mostrando una disminución de alrededor de 3 ciclos log y dejando de considerarse un alimento probiótico (Muñoz y Alarcón 2010). Mientras que a los 25 días la cantidad de probióticos aún eran mayores a 6 log UFC/g, se determinó este tiempo como vida útil del producto.



**Figura 6:** Viabilidad de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595.

Del estudio de vida útil, el producto presentó ausencia total de microorganismos patógenos en el periodo de los 25 días de almacenamiento, tanto en condiciones aceleradas como al ambiente.

La Tabla 12 indica la respuesta de los jueces a la evaluación sensorial de calidad, en la cual se observa que la afectividad de los atributos no varía al pasar los días, obteniendo una evaluación general inicial de 7,7 y una final de 7,6.

**Tabla 11:** Evaluación sensorial de calidad de los atributos del chocolate con el recubrimiento comestible.

Días	Apariencia	Olor	Sabor	Textura
0	6,8 ± 0,632	7,4 ± 0,843	8,4 ± 0,699	8,2 ± 0,788
4	6,7 ± 0,949	7,8 ± 0,919	8 ± 0,788	8,3 ± 0,823
7	6,9 ± 0,738	7,9 ± 0,994	8,1 ± 0,876	8,5 ± 0,707
11	6,7 ± 0,675	7,8 ± 1,032	7,5 ± 0,843	7,9 ± 0,949
14	7 ± 0,471	7,4 ± 0,853	8,1 ± 0,994	8,2 ± 0,678
18	7 ± 0,816	8,1 ± 0,876	7,9 ± 0,994	7,6 ± 0,994
21	7 ± 0,667	7,5 ± 0,972	8,4 ± 0,599	8,2 ± 0,816
25	6,6 ± 0,967	8 ± 0,816	7,9 ± 0,876	7,9 ± 0,943
28	7,1 ± 0,876	7,7 ± 1,129	8 ± 0,816	8,2 ± 0,919

Los datos son media ± desviación estándar de 10 jueces semientrenados.

### CAPITULO III

#### DISCUSIONES

El estudio experimental desarrollado, permitió identificar los factores más influyentes en el pH y en la viabilidad a los 10 días del *Lactobacillus rhamnosus* ATCC9595 adicionado en el recubrimiento comestible. En el caso del pH, no se identificaron influencias significativas de ninguno de los factores, obteniendo  $p > 0,05$ . Por otro lado, en el análisis realizado a las respuestas variables de la viabilidad del microorganismo, se pudo observar que los factores que más influenciaron fueron el probiótico ( $p = 0,000$ ) y la inulina ( $p = 0,004$ ) por sí solos. De esta manera se puede corroborar con Bustamante *et al.* (2006) que menciona que la inulina estimula la proliferación de bacterias probióticas, lo que quiere decir que, mientras más cantidad de inulina y probiótico, mayor viabilidad tendrá el mismo. La mezcla de inulina, gnetina y el suero de la leche (variable no estudiada) pueden formar una red tridimensional estable, la misma que puede ser un buen vehículo y un medio óptimo donde pueden albergar componentes como los probióticos (García *et al.* 2014).

En el análisis sensorial, los jueces mostraron una aceptación global del producto del 86 %, de esta manera podemos considerar al alimento con una aceptación sensorial alta y que el recubrimiento no influyó en las características organolépticas del producto. Todos los atributos evaluados tuvieron un alto puntaje sensorial. Los factores mejor evaluados fueron el sabor y la textura, seguidos por el olor y, con un menor puntaje, la apariencia. Este último es de gran importancia debido a que es la primera impresión que el consumidor tiene del producto. Las observaciones generales de los jueces fue que al producto le faltaba brillo, y según Ruiz *et al.* (2016) esto es debido a que el chocolate al ser aplicado un recubrimiento tiende a secarse externamente. El estudio realizado por Jáuregui (2006) obtuvo valores de aceptación similares a este trabajo en los diferentes factores evaluados.

La humedad en el chocolate con el recubrimiento se mantuvo entre 2,21 % y 2,84 % durante los 25 días de almacenamiento, de tal manera que el recubrimiento no influyó en este parámetro; sin embargo, en el día 18 hubo una variación de humedad a comparación de los demás días obteniendo 3,41 %, el mismo que pudo ser por diferentes factores como las condiciones de almacenamiento, por manipulación, por el equipo utilizado, entre otros. No existe normas que regulen la humedad en chocolates; sin embargo, se tomó como referencia la norma INEN 620 "cacao en polvo" (ver Anexo 3) el mismo que permite una humedad de máxima del 6 %, por lo cual se encuentra dentro del parámetro establecido. En el estudio realizado por García *et al.* (2016), quienes usaron recubrimientos en galletas, indicaron que tuvieron ganancias de un 5 % de humedad durante el almacenamiento.

El Instituto Ecuatoriano de Normalización, (2011) y el Codex Alimentarius, (2010) especifican que la cantidad mínima de bacteria para que un alimento se pueda considerar probiótico, debe ser de 6 log UFC/g. En el presente estudio se obtuvo una viabilidad inicial de 9,247 log UFC/g mientras que a los 25 días de almacenamiento se obtuvo 6,0299 log UFC/g, indicando que terminaba la vida útil del producto desde el punto de vista probiótico. De esta manera se puede observar que mientras pasa el tiempo los microorganismos disminuyeron entre uno, dos y tres ciclos logarítmicos. Resultados similares fueron reportados por Makay y Rodríguez (2015), pudiendo haber influenciado en la disminución de bacterias diferentes factores como: las condiciones de almacenamiento, la cantidad de recubrimiento inicial aplicado o el producto utilizado.

La vida útil del producto se evaluó con el propósito de garantizar la salud de los consumidores, por lo que se realizó análisis microbiológicos. Los resultados mostraron ausencia total de microorganismos patógenos en el periodo de 25 días de almacenamiento, cumpliendo de esta manera con los parámetros establecidos por la Norma INEN 0621. La ausencia de microorganismos patógenos, tiene una relación directa con los microorganismos probióticos ya que varias investigaciones como la de Monroy *et al.* (2009) demuestran la capacidad de los probióticos para inhibir o reducir a las bacterias patógenas. A esto se suma la cantidad baja de humedad que tiene el alimento, la misma que no es la adecuada para la proliferación de bacterias (Lujan *et al.* 2017). Adicional a lo anterior, se realizó vida útil por medio de análisis sensorial el mismo que presentó una aceptabilidad del día inicial similar al que se realizó a los 25 días, que fue de 86 % y 84 %, respectivamente. García *et al.* (2016) en su estudio de recubrimiento comestible con *L. casei* aplicado en galletas indican que al pasar los días obtuvieron cambios significativos en los factores (apariencia, sabor, olor, textura, entre otros) dejando de ser aceptado por los jueces a los 15 días de almacenamiento. Sarria *et al.* (2014) aplicaron recubrimientos sin probióticos en mangos obteniendo una aceptación sensorial hasta el día 24, pero cabe recalcar que las muestras evaluadas estuvieron almacenadas en refrigeración y se les aplicó antioxidantes previo al almacenamiento. Ramírez *et al.* (2013) en su estudio de recubrimientos en moras indican que al pasar 10 días obtuvieron cambios significativos en los diferentes factores y concluyen que el comportamiento fue quizás debido a la actividad enzimática propia del alimento que usaron en su investigación.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se cumplieron los objetivos establecidos, de los cuales se obtuvieron resultados interesantes. En el estudio exploratorio realizado, se obtuvo como mejor respuesta la formulación que tenía mayor cantidad de inulina, gnetina y probiótico. La inulina es un medio adecuado para la viabilidad del *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 y la gnetina, al interactuar con el suero de leche, ayuda a formar una red tridimensional estable la misma que sirve como vehículo de distintos componentes. Por lo tanto, a mayor cantidad de los mismos existirá mayor viabilidad.

Por otra parte, el producto con el recubrimiento obtuvo una aceptación sensorial alta por parte de los jueces. Se demostró la viabilidad de los *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595 en el chocolate recubierto, en cantidades mayores a 6 log UFC/g por un periodo de 25 días, por lo que se puede considerar un alimento probiótico. También se demostró que no hubo presencia bacterias patógenas en el producto. Posiblemente pudo ser por la acción del *Lactobacillus rhamnosus*, que según la literatura ayudan a inhibir a bacterias patógenas.

Los probióticos tienen innumerables beneficios como aliviar diarreas, prevenir enfermedades intestinales, ayudar en la microflora, entre otros. Tener recubrimientos comestibles con probióticos es otra alternativa para el consumo de los mismos, ya que podrían ser aplicados en diferentes alimentos como frutas, carnes, galletas, chocolates, caramelos, por nombrar algunos. Esto da un valor agregado al producto y además incentiva y facilita a la población el consumo de estas bacterias beneficiosas para la salud.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda seguir con el estudio y analizar características texturales y propiedades físico químicas, que en el presente no se pudo realizar. Además, realizar un estudio exploratorio con las demás variables, como el suero de leche, el agua, la glicerina entre otros, que pudieron haber intervenido en los modelos obtenidos en la investigación.

Se recomienda usar recubrimientos comestibles con probióticos en otros productos perecederos y estudiar cómo influyen en la vida útil, en la parte sensorial y en las características físico químicas y texturales de los mismos.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ada Lydia de las Cagigas, Jorge blanco. «Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa». *Revista Cubana Aliment Nutr* 16, n.º 1 (2002): 63-68.
- Alarcón Gilberto Francisco. «Impregnación de *Lactobacillus rhamnosus* en placas de manzana utilizando una emulsión doble del tipo W1/O/w2.» BS Tesis, Veracruzana, 2014.
- Albizú, Helen C., and Marlon F. Ac. *Desarrollo de un recubrimiento comestible a base de proteína de suero de leche para queso cheddar*. BS tesis. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2012., 2011.
- Argueta, Imelda García, Quintero Salazar Baciliza, y Domínguez López Aurelio. «Effect of Edible Coating Based on Whey, Inulin and Gelatine with *Lactobacillus Casei* on the Textural and Sensorial Properties of a Cracker Cookie». *Journal of Probiotics & Health* 4, n.º 3 (2016): 2-7.
- Barboza Lourdes. «Aplicación de Films Comestibles en la Industria Alimentaria». Nacional de Trujillo, BS tesis, 2015.
- Bustamante Patricia, Lino Mayorga, Ramírez Hugo, Martínez Patricia, Barranco Esteban, y Azaola Alejandro. «Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica». *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37, n.º 2 (2006): 5-9.
- Cáceres R, Paola, y Gotteland R, Martín. «Alimentos probióticos en Chile: ¿qué cepas y qué propiedades saludables?» *Revista chilena de nutrición* 37, n.º 1 (2010): 97-109.
- Cerón, R., Quintero, J. «Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola». *Revista Tumbaga* 1, n.º 5 (2010): 93-118.
- Cordero-Bueso Gustavo A. "Aplicación del Análisis Sensorial de los Alimentos en la Cocina y en la Industria Alimentaria." *Sede de Carmona de la Universidad Pablo de Olavide, XI* (2014): 13-96.
- Cruz González, Gonzalo. "Análisis de datos provenientes de pacientes intervenidos de TAVI." (2015).

- Durango Alba Manuela, Soares Nilda y Arteaga Margarita Rosa. «Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos». [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text](http://purl.org/dc/dcmitype/Text). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA, 2011.
- Dussán-Sarria, Saúl, Cristian Torres-León, and José I. Hleap-Zapata. "Efecto de un Recubrimiento Comestible y de Diferentes Empaques durante el Almacenamiento Refrigerado de Mango Tommy Atkins Mínimamente Procesado." *Información tecnológica* 25.4 (2014): 123-130.
- Foteini Pavli, Tassou Cysoula, Nychas George "Incorporación de probióticos en películas y recubrimientos comestibles: solución bioactiva para alimentos funcionales". *Revista internacional de ciencias moleculares* 19.1 (2018): 150.
- Galiotta Giovanni, Harte Federico, Molinari Daniel, Capdevielle Rossana, y Diano Washington. «Aumento de la vida útil pos cosecha de tomate usando una película de proteína de suero de leche». *Revista Iberoamericana de Tecnología Pos cosecha* 6, n.º 2 (2005): 117-123.
- Galindo Orellana Xavier Eduardo. *Determinación de la factibilidad del uso de la bacteria Lactobacillus plantarum, aplicada a masas de harina de trigo para reducción del gluten*. BS thesis. Universidad del Azuay, 2016.
- García Imelda. *Efecto de un recubrimiento comestible adicionado con Lactobacillus casei shirota, sobre las características fisicoquímicas, texturales, y sensoriales de una galleta tipo habanera*. Universidad autónoma del estado de México, Facultad de ciencias agrícolas, 2014.
- Guerra Caridad, A. Cabrera, y Fernández Lucía. «Criterios para la selección de modelos estadísticos en la investigación científica». *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 37, n.º 1 (2003): 3-9.
- Günther, Jorge, y Jiménez-Montealegre Ricardo. «Efecto del probiótico *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y alimentación de tilapia (*Oreochromis niloticus*) y langostino (*Macrobrachium rosenbergii*) en laboratorio». *Revista de Biología Tropical* 52, n.º 4 (diciembre de 2004): 937-43.
- Gutiérrez Ramírez Luz Adriana, Gómez Ospina Astrid Johana, Arias Jaramillo Lina Marcela, y Tangarife Patiño Bibiana. «Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema». *Revista Lasallista de Investigación* 4, n.º 2 (2007):

37-42.

Huertas Parra, A. «Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos». *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 62, n.º 1 (2009): 4967-4982.

Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). *NTE INEN 0621: Chocolates. Requisitos*, 2010.

Jáuregui Andrés. «Desarrollo de nueces (*Juglans regia*) de la variedad semilla californiana recubierta con miel». Tesis, Universidad de Chile, 2006.

Jaramillo Giraldo Diana, Meléndi Adelina del Pilar. «Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*». *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1, n.º 2 (2010): 193-209.

Laurentin Alexander, Tapia María, Lovera Mighay, Rojas Carlos, Gamero Moisés, Ann Edwards Christine, Diez Nardy, Bernal Carolina y Carmona Andrés. «Estudios nutricionales con el bioensayo del gorgojo de arroz, *Sitophilus oryzae*.» *Memorias del Instituto de Biología Experimental* 5, (2008): 57-60.

Lebeer, S., T. L. A. Verhoeven, G. Francius, G. Schoofs, I. Lambrichts, Y. Dufrene, J. Vanderleyden, y S. C. J. De Keersmaecker. «Identification of a Gene Cluster for the Biosynthesis of a Long, Galactose-Rich Exopolysaccharide in *Lactobacillus Rhamnosus* GG and Functional Analysis of the Priming Glycosyltransferase». *Applied and Environmental Microbiology* 75, n.º 11 (2009): 3554-3563.

Londoño Margarita, Sepúlveda José, Hernández Aldo, y Parra Jaime. «Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*». *Ciencias Agropecuaria* 61, n.º 1 (2008): 4409-21.

López-Jácome Luis Esaú, Hernández-Durán Melissa, Colín-Castro Claudia Adriana, Ortega-Peña Silvestre, Cerón-González Guillermo, y Franco-Cendejas Rafael. «Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología» *Investigación en Discapacidad* 3, (2014): 10-18.

Luján Urviola Eduardo. "Efecto del chip de Tetraciclina y Minociclina en la proliferación Bacteriana de la microflora de bolsas Periodontales. Arequipa, 2017." (2017)

Makay José Chang y Rodríguez Zevallos Antonio. "Efecto de la concentración de goma de tara y sorbato de potasio en película comestible sobre las características fisicoquímicas,

- microbiológicas y sensoriales en queso mantecoso." *Pueblo Continente* 23.2 (2015): 381-390.
- Montero Flor Diego Hernán. *Determinación de producción de bacteriocinas a partir de Lactobacillus casei*. BS tesis. Universidad del Azuay, 2016.
- Monroy María del Carmen, Castro Thalía, Fernández Francisco, y Mayorga Lino. «Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas.» *ContactoS* 73 (2009): 63-72.
- Muñoz Salas, K., y Alarcón Palacios M. «Efecto de los Probióticos en las Condiciones Periodontales». *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 3, n.º 3 (1 de diciembre de 2010): 136-39.
- Myers. R, Montgomery. D, Anderson-Cook. C. (2016). *Response Surface Methodology*. Wiley: Hoboken.
- «NTE INEN 0620: Cacao En Polvo. Requisitos». [studylib.es](http://studylib.es). Accedido 16 de noviembre de 2018.
- «NTE INEN 2395: Leches Fermentadas. Requisitos». [studylib.es](http://studylib.es). Accedido 16 de noviembre de 2018.
- Olagnero Gabriela, Abad Andrea, Bendersky Silvia, Genevois Carolina, Granzella Laura, y Montonati Mara. «Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos». *Diaeta* 25, n.º 121 (2007): 20-33.
- Olveira Fuster, G., González Molero, I. «Probióticos y prebióticos en la práctica clínica». *Nutr Hosp.* 22, n.º 2 (2007): 23-34.
- Pérez-Leonard Heidy, Bueno-García Gloria, Brizuela-Herrada María Antonieta, Tortoló-Cabañas Keyla, y Gastón-Peña Cristina. «Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos». *ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar*, 47, n.º 1 (2013): 14-25.
- Ramírez José Carmen, Rosas Ulloa Petra, Velázquez Martha Yanira, Ulloa José Armando, y Arce Romero Francisco. «Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud». *Centro de Tecnología de Alimentos* 2, n.º 7 (2011): 16.

- Ramírez, Jhon D., Iván D. Aristizabal, and Jorge I. Restrepo. "Conservación de mora de castilla mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila." *Vitae* 20.3 (2013)
- Ramírez Luz Stella, y Castaño Darwin Marín. «Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal». *Scientia et technica* 2, n.º 42 (2009).
- Tapia Nuñez Valdemar. «Guía práctica para la solución e interpretación de diseño de experimentos». Tesis, universidad autónoma de Chihuahua, 2016.
- Velázquez Moreira, A., Guerrero Beltrán, J. «Algunas investigaciones recientes en recubrimientos comestibles aplicados en alimentos» *Temas selectos de Ingeniería en alimentos* 2, (2014): 5-12.
- Valík Ubomír, Alžbeta Medve, y Denisa Liptáková. «Characterization of the Growth of *Lactobacillus Rhamnosus* GG in Milk at Suboptimal Temperatures». *Journal of Food and Nutrition Research* 47, n.º 2 (2008): 60-67.
- Zuluaga Natalia. «El análisis sensorial de alimentos como herramienta para la caracterización y control de calidad de derivados lácteos.» Universidad Nacional de Colombia, 2017.

## ANEXOS

Nombre..... Fecha.....

Frente a Ud. se encuentra un producto. Por favor observe y deguste. Indique el grado que le gusta o disgusta cada atributo de la muestra, señalando con una (X) lo que corresponda.

Atributos	Me disgusta extremadamente.	Me disgusta mucho.	Me disgusta moderadamente.	Me disgusta levemente.	No me gusta, ni me disgusta.	Me gusta levemente.	Me gusta moderadamente.	Me gusta mucho.	Me gusta extremadamente.
Olor									
Color									
Sabor									
Textura									

### Anexo 1: Ficha de catación

**TABLA 2. Requisitos microbiológicos para los chocolates**

	n	m	M	c	Método de ensayo NTE INEN
Aerobios mesófilos	5	$2,0 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$ *	2	1529-5
Aerobios mesófilos	5	$2,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	2	1529-5
Coniformes totales	5	0	$1,0 \times 10^2$	2	1529-7
Mohos y levadura	5	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	2	1529-10
Salmonella	10	0	-----	0	1529-15

\* Solo para chocolate con leche

### Anexo 2: Requisitos microbiológicos para chocolates. Norma INEN 0621

**Tabla 1. Requisitos de cacao en polvo**

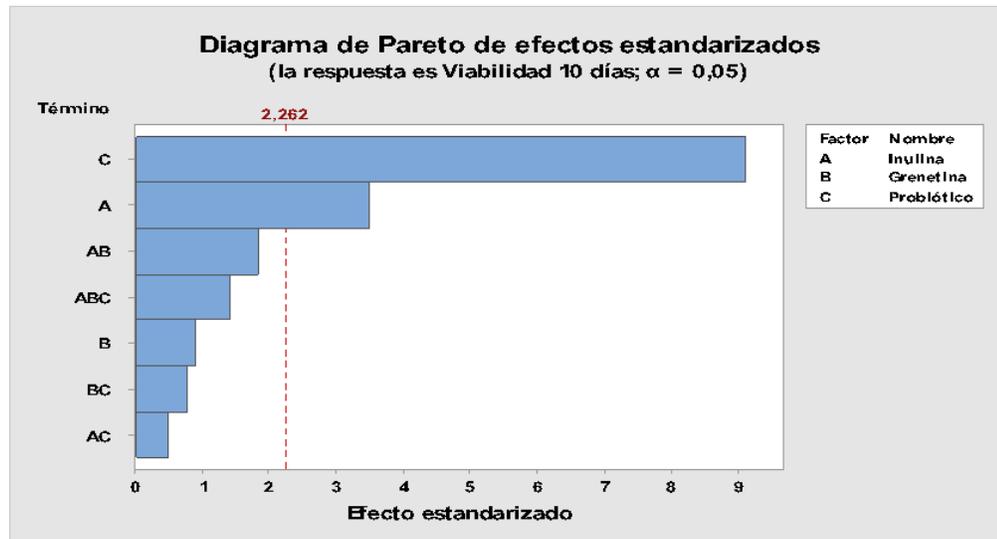
REQUISITO	UNIDAD	CACAO EN POLVO		CACAO EN POLVO SOLUBLE		MÉTODO DE ENSAYO
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Humedad o pérdida por calentamiento	%	—	5	—	6	INEN 1 676

### Anexo 3: Requisitos de humedad en cacao en polvo.

**TABLA 2. Cantidad de microorganismos específicos en leche fermentada sin tratamiento térmico posterior a la fermentación**

PRODUCTO	Yogur, kumis, kéfir, leche cultivada, leches fermentadas con ingredientes y leche fermentada concentrada Mínimo	kéfir y kumis Mínimo
Suma de microorganismos que comprenden el cultivo definido para cada producto	$10^7$ UFC/g	
Bacterias probióticas	$10^8$ UFC/g	
Levaduras		$10^4$ UFC/g

**Anexo 4:** Cantidad de microorganismos probióticos.



**Anexo 5:** Diagrama da Pareto de efectos estandarizados de viabilidad bacteriana a los 10 días.