



Revista Colombiana de Biotecnología

ISSN: 0123-3475

revcbib_bog@unal.edu.co

Universidad Nacional de Colombia

Colombia

Garcia Gonzalez, Estefania; Serna Cock, Liliana

Viabilidad de una bacteria láctica encapsulada e incorporada en una matriz de cobertura
de chocolate

Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XVII, núm. 1, junio, 2015, pp. 40-45

Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77639196006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Viabilidad de una bacteria láctica encapsulada e incorporada en una matriz de cobertura de chocolate

Viability of encapsulated lactic bacteria added in a matrix of chocolate coverage

Estefania Garcia Gonzalez*, Liliana Serna Cock**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.44824

Resumen

Se evaluó la viabilidad durante el almacenamiento de *Weissella confusa* incorporada en una matriz de cobertura de chocolate. La bacteria probiótica se encapsuló empleando tres materiales de pared, gel de Aloe vera, gel Aloe vera + Almidón al 10 % y gel de Aloe vera + Almidón al 15 % y células libres como control. Posteriormente se liofilizó. La bacteria probiótica encapsulada, se incorporó en una matriz de cobertura de chocolate. Los chips se empacaron y almacenaron durante 5 semanas a 4 °C, cada semana se midieron cambios en la viabilidad de la bacteria probiótica y en la actividad de agua. En la quinta semana, los chips se sometieron a condiciones simuladas de jugos intestinales. Durante el almacenamiento los chips mantuvieron su carácter probiótico ($>10^6$ UFC/g), sin embargo, cuando la bacteria probiótica se encapsuló en gel aloe vera, se obtuvo mayor número de bacterias probióticas vivas dentro de la matriz sólida ($2,1 \times 10^8$ UFC/g). La actividad de agua varió de 0,470 a 0,810. La bacteria probiótica permaneció viva por 2 horas en medios simulados de jugos intestinales, lo cual ratifica que la matriz sólida y los medios de encapsulación seleccionados son adecuados para el desarrollo de productos sólidos probióticos ricos en grasa vegetal.

Palabras clave: probiótico, chip, encapsulación, Aloe, almidón, viabilidad celular.

Abstract

Viability during storage of *Weissella confusa* incorporated in a chocolate coating matrix was evaluated. Probiotic bacteria was encapsulated using three wall materials, Aloe vera gel, Aloe vera gel + 10 % starch and aloe vera gel + 15 % starch and free cells as control. Subsequently lyophilized. Probiotic bacteria encapsulated, was incorporated into a chocolate coating matrix. The chips were packed and stored for 5 weeks at 4 °C, were measured weekly changes in viability of the probiotic bacteria and water activity. In the fifth week, the chips were subjected to simulated conditions of intestinal juices. During storage chips remained probiotic character ($>10^6$ CFU/g), however, if the probiotic bacteria are encapsulated in aloe vera gel, the greater number of living probiotic bacteria was obtained within the solid matrix ($2,1 \times 10^8$ CFU/g). Water activity ranged from 0.470-0.810. Probiotic bacteria remained alive for 2 hours in simulated intestinal fluid media, which confirms that the solid matrix and the selected encapsulation means are suitable for the development of solid product rich in vegetable fat probiotics.

Key words: probiotic, chip, encapsulation, Aloe, starch, cellular viability.

Recibido: septiembre 16 de 2014

Aprobado: abril 20 de 2015

Introducción

La selección de matrices alimentarias adecuadas para incorporar probióticos, es un factor importante que se debe considerar en el desarrollo de alimentos probióticos (Ranadheera et al., 2010). Se ha reportado que

las mejores matrices para las bacterias probióticas son los productos lácteos fermentados (Rivera y Gallardo, 2010), sin embargo, se ha presentado demanda creciente de productos probióticos no lácteos, por lo cual los probióticos se están incorporando en matrices só-

* Ingeniera Agroindustrial, Universidad Nacional de Colombia – Palmira (Valle del Cauca, Colombia), Cra 32 No 12 – 00 Vía Candelaria, egarciagon@unal.edu.co

** PhD Ing. Alimentos, Universidad Nacional de Colombia – Palmira (Valle del Cauca, Colombia), Cra 32 No 12 – 00 Vía Candelaria, lserna@unal.edu.co

lidas y líquidas, y están siendo comercializados como suplementos en forma de pellets, cápsulas y liofilizados (Ranadheera et al., 2010; Rivera y Gallardo, 2010).

En el diseño de éstos nuevos productos probióticos se deben tener en cuenta además, la viabilidad del microorganismo dentro de la matriz alimentaria y su actividad funcional (Jankovic et al., 2010; Da Silva, 2011). La inclusión de microorganismos probióticos en una matriz de alimento seco tendría muchas ventajas en comparación a matrices líquidas (Ouwehand et al., 2004). Sin embargo, para que la matriz sólida probiótica tenga efectos benéficos en la salud humana, es necesario asegurar que las bacterias se mantengan vivas durante el almacenamiento del producto, y que una vez consumido el producto, los microorganismos probióticos resistan el paso por el sistema gastrointestinal (Burgain et al., 2011).

Una alternativa para incrementar la eficacia de los probióticos es incorporarlos en matrices alimentarias que proporcionen protección (Possemiers et al., 2010); se han mostrado desarrollos en la incorporación de probióticos en matrices basadas en chocolates como mousse, torta y barras de chocolate (Aragon et al., 2007; Malmo et al., 2011; Possemiers et al., 2010), mostrando que el chocolate es un buen vehículo para la incorporación de probióticos, debido a su contenido en lípidos y carbohidratos. Uno de los sucedáneos del chocolate es la cobertura de chocolate y una de sus formas más comunes es el chip, que se emplea en la elaboración de galletas, helados y tortas frías, por lo que resulta innovador vehiculizar a los probióticos en esta matriz.

Weissella confusa es una bacteria ácido láctica, que en la actualidad se le considera con potencial probiótico ya que presenta actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos patógenos (Nam et al., 2002; Serna et al., 2010; Ayeni et al., 2011; Lee et al., 2012). De igual manera, se ha encontrado que el aloe vera es un material de pared promisorio para encapsular esta bacteria láctica (Serna et al., 2012). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar durante el almacenamiento, cambios en la viabilidad del microorganismo probiótico, y cambios en la actividad de agua de chip probióticos elaborados con cobertura de chocolate y con la bacteria ácido láctica *Weissella confusa*, encapsulada en diferentes materiales de pared. Además, determinar la resistencia del microorganismo probiótico bajo condiciones simuladas de jugos intestinales.

Materiales y métodos

Bacteria probiótica

Se utilizó una cepa crioconservada de la bacteria ácido láctica *Weissella confusa*, la cual se aisló en estudios previos de Serna et al. (2010). Para obtener la cantidad

necesaria de bacterias se realizaron fermentaciones en discontinuo, utilizando como sustrato de fermentación caldo MRS (Scharlau España) (De Man et al., 1960), al cual se le adicionó 40 gL⁻¹ de glucosa como fuente de carbono. El sustrato se inoculó con el 10 % de caldo previamente inoculado con respecto al volumen del sustrato. Se realizaron 4 fermentaciones en erlenmeyer de 1000 ml, los cuales permanecieron agitados elipsoidalmente a 100 rpm, por 6 horas, a 37 °C (equipo Incubating Orbital Shaker model 5000I, USA). Transcurrido el tiempo de fermentación se separaron las bacterias, centrifugando el fermentado a 4480 x g (Eppendorf AG, Alemania). El sobrenadante se descartó y el precipitado se lavó con 5 ml de NaCl al 0,9 % y se centrifugó por 5 min a 4480 x g. El precipitado se lavó nuevamente con 10 ml de agua destilada estéril, se centrifugó por 5 min a 4480 x g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las bacterias probióticas se encapsularon.

Encapsulación de las bacterias probióticas

Se utilizó gel de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) y almidón comercial (Industrias del maíz AMISOL 2143, Colombia) a dos concentraciones 10 y 15 % como materiales de encapsulación (mejores resultados de encapsulación no documentados). El gel de aloe vera se sometió a tratamiento térmico a 65 °C durante 15 min en un baño termostático (Julabo 13A, Alemania), y se almacenó en refrigeración a 4 °C. El almidón al 10% y al 15% se utilizó combinado con aloe vera en proporción de 1:1. Las bacterias probióticas obtenidas por fermentación, en concentración de 10¹¹ UFC/g, se mezclaron en relación 1:4 con los materiales de encapsulación. A las bacterias encapsuladas en aloe vera se les designó tratamiento AV, encapsuladas en aloe vera+almidón al 10% (AA10%) y encapsuladas en aloe vera+almidón al 15 % (AA15 %). Posteriormente las bacterias encapsuladas se liofilizaron (Eyela FDU 1100, Japón) (congelación a -20 °C, presión de vacío de 2 Pa y temperatura en el condensador de -60 °C, temperatura de secado 25 °C). Como tratamiento control se utilizó la bacterias probiótica (*W. confusa*) no encapsulada, diluida en agua destilada estéril (CL). El control CL se liofilizó en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Preparación y almacenamiento de chip de cobertura de chocolate probiótico

Se empleó cobertura de chocolate negro (Nacional de Chocolates, Colombia) con un contenido de grasa de 37 g/100g. La cobertura de chocolate se fundió a 48 °C y se atemperó a 30°C. Posteriormente, a la cobertura de chocolate fundida se le adicionó, por separado, los tratamientos AV, AA10, AA15 y CL, se homogenizaron manualmente. La mezcla se vertió en moldes de PET (calibre 15) para chip de 6 mm de diámetro, los chips se solidificaron a una temperatura de

4 °C, se desmoldaron y se empacaron en bolsas de poliamida, laminada con polietileno de baja densidad, con permeabilidad de 4,4 – 4,9 g/m²/h/atm. Los chips probióticos se almacenaron en refrigeración a 4 °C. La temperatura de 4°C se seleccionó ya que los chips son ampliamente utilizados para la fabricación de tortas refrigeradas, postres, helados, entre otros.

Determinación de la viabilidad de las bacterias probióticas

La viabilidad de las bacterias probióticas se midió inmediatamente después del proceso de liofilización, y cada semana chips durante el almacenamiento (5 semanas).

Para determinar el número de bacterias vivas en cada tratamiento, en frascos de dilución se tomó 1 g de chips de cada tratamiento (o 1 g del tratamiento control) y 9 ml de agua peptona al 0,1 % previamente atemperado a 48 °C, se agitaron durante 1 minuto en vortex (Reidolph Reax control, Alemania), con el fin de liberar las bacterias de su material de encapsulación. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales empleando agua peptona al 0,1 %, las muestras se sembraron a profundidad en agar MRS, el conteo se realizó después de 48 h de incubación a 37 °C. Se contaron las cajas que contenían entre 30 y 300 colonias y el recuento de células vivas se expresó en UFC g⁻¹.

La viabilidad de los microorganismos probióticos se determinó con la ecuación 1:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{N}{N_0} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde, para la encapsulación: N₀ es el número de bacterias vivas por gramo antes del proceso de encapsulación, y N: es el número de bacterias vivas por gramo después de la encapsulación.

Para la liofilización, N₀ es el número de bacterias vivas por gramo después de la encapsulación, y N: es el número de bacterias vivas por gramo después de la liofilización.

Para el almacenamiento: N₀ es el recuento de bacterias vivas en el momento de la elaboración de los chips probióticos y N: es el número de bacterias vivas por gramo en cada semana de almacenamiento.

Actividad de agua (a_w)

Durante el almacenamiento se midió la actividad de agua de los chips probióticos, empleando un medidor de actividad de agua (Agualab Model Serie 3 TE, USA) a temperatura de 25 °C.

Resistencia de la bacteria probiótica a jugos intestinales simulados

La mayor composición en nutrientes de los chips de chocolate es la grasa vegetal. El proceso de absorción

de grasas, se realiza principalmente en el intestino delgado, donde intervienen la bilis y las lipasas pancreáticas, ambos compuestos con pH alcalino (Cueto y Aragón, 2012), por lo cual, después de 5 semanas de almacenamiento, los diferentes tratamientos se sometieron a medios simulados de jugos intestinales empleando la metodología modificada de Malmo et al., 2011. Los jugos intestinales (JI) se prepararon con sales biliares al 4,5% (p/v) (Sharlau, Barcelona, España) y se ajustaron a pH 8,0 con NaOH 0,1 mol/L estéril. La solución se esterilizó por filtración utilizando una membrana de 0,22 µm. Los chips probióticos se macearon, y 0,5g de chips se agregaron a 45 ml de la solución JI, se llevaron a agitación elipsoidal (80 rpm) en un shaker (Incubating Orbital Shaker, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) por 2 horas a 37 °C. La viabilidad de la bacteria probiótica se midió en el momento de mezclar los chips con JI y a las 2 horas. La viabilidad se midió de la misma forma descrita arriba.

Diseño experimental

Para evaluar durante el almacenamiento de los chips probióticos, el efecto de los materiales de encapsulación sobre la viabilidad del probiótico, y la aw del producto, se utilizó un diseño unifactorial con medidas repetidas en el tiempo. Como factor se utilizó material de encapsulación de la bacteria probiótica con tres niveles (AV, AA10 % y AA15 %). Las variables de respuesta fueron la actividad de agua y el porcentaje de viabilidad del probiótico. Las variables de respuesta se midieron en 6 tiempos (0, 1, 2, 3, 4 y 5 semanas de almacenamiento). Se realizó una prueba de Tukey para diferencias entre medias con un nivel de significancia del p-valor < 0.05 y los datos se analizaron a través del software SAS versión 9.3. Adicionalmente se midió la viabilidad del probiótico después de la liofilización, en los tres tratamientos AV, AA10 % y AA15 % y después de que cada tratamiento se sometió dos horas a jugos intestinales.

Resultados y discusión

Viabilidad de la bacteria probiótica después de la liofilización en los tratamientos AV, AA10% y AA15%

El tratamiento AV presentó el mayor porcentaje de bacterias probióticas vivas, después del proceso de liofilización (tabla 1). Estos resultados coinciden con los reportados por Abadias et al. (2001), quienes evaluaron la viabilidad de *Candida sake*, al recubrirla con diferentes materiales protectores durante la liofilización, obteniendo viabilidades del 0,2 % cuando empleó una concentración de glucosa y fructosa al 1 % y una viabilidad del 1 % cuando se empleó una solución de galactosa al 1 %.

Una explicación a la disminución drástica de la viabilidad durante la liofilización se le puede atribuir a la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación, los cuales causan daño en la membrana celular de las bacterias (Homayouni *et al.*, 2008), se suman a ésta, la baja solubilidad del almidón y la posible nucleación y separación de fases (cristalización) de los azúcares del aloe vera (Pehkonen *et al.*, 2007), ya que la cristalización del azúcar desactiva la interacción entre el azúcar y las estructuras celulares, interacción que se cree provee una protección adicional a las células (Crowe *et al.*, 1998 citado por Foerst *et al.*, 2011).

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad del probiótico (*W. confusa*) después del proceso de liofilización, y recuento inicial del probiótico una vez se ha incorporado al chocolate.

Tratamiento	% Viabilidad	Células en chocolate (UFC/g)
CL	0,084 ± 0,010	2,8x10 ⁹ ± 4,24x10 ⁷
AV	1,184 ± 0,110	4,2x10 ⁸ ± 1,41x10 ⁶
AA10	0,183 ± 0,065	2,8x10 ⁷ ± 4,24x10 ⁵
AA15	0,005 ± 0,001	1,0x10 ⁶ ± 4,24x10 ⁴

Viabilidad de la bacteria probiótica en chips de cobertura de chocolate durante el almacenamiento

En la primera semana de almacenamiento se presentaron diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre tratamientos (figura 1). El tratamiento CL presentó la mayor viabilidad, seguido por los tratamientos AV, AA15 y AA10.

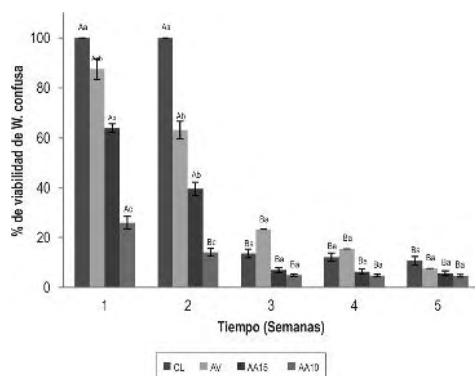


Figura 1. Porcentaje de viabilidad de *Weissella confusa* en chips de chocolate, almacenados durante 5 semanas.

Las letras mayúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.0001$) para un mismo tratamiento durante el tiempo evaluado. Las letras minúsculas indican diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre diferentes tratamientos una misma semana.

El comportamiento de CL a la primera y segunda semanas de almacenamiento indica que la cobertura de chocolate es una matriz alimentaria que por sí sola provee protección inicial a las células (Nebesny *et al.*, 2007; Aragon *et al.*, 2007). Sin embargo a la tercera semana de almacenamiento, el tratamiento CL, presentó un descenso drástico en la viabilidad. Este comportamiento se podría explicar porque la grasa presente en la cobertura de chocolate (37 g/100 g) proporciona protección a la bacteria probiótica, evitando que las células sean expuestas al agua (presente en la cobertura de chocolate y en el espacio de cabeza del empaque) y evitando factores de estrés como el que producen los iones H^+ (Lahtinen *et al.*, 2007), sin embargo es posible que al transcurrir el tiempo de almacenamiento las capas de grasa de la matriz formen grietas por donde el agua puede migrar directamente (Weinbreck *et al.*, 2010). Otras causas atribuibles al descenso en la viabilidad del probiótico pueden ser las reacciones de deterioro de la cobertura de chocolate como la oxidación de los fitoesteres, lo cual puede generar varios tipos de hidroxi, epoxi, ceto y derivados de triol (Botelho *et al.*, 2014), los cuales tienen actividad antimicrobiana (Brudzynski, 2006). Además, los sucedáneos del chocolate, como la cobertura de chocolate contienen polifenoles, que provienen del cacao y ejercen efectos antimicrobianos (Possemiers *et al.*, 2010), con la consecuente pérdida de viabilidad.

En la figura 2 se presenta el recuento de células durante 5 semanas de almacenamiento. Para todos los tratamientos la concentración final de células estuvo en el rango donde se considera al alimento como probiótico ($10^6 - 10^7$ UFC/g) (Krasaekoopt *et al.*, 2003), concentraciones recomendadas para el consumo de alimentos probióticos (FAO/WHO, 2001). Los productos que contienen probióticos, deben almacenarse en refrigeración para mantener una alta viabilidad. El periodo de expiración para estos productos, ya sea jugo o barra, es más corto que en productos sin probióticos (Christopher *et al.*, 2009).

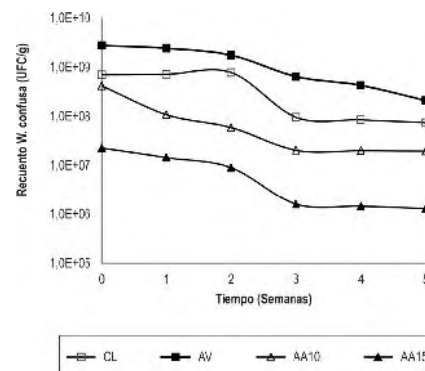


Figura 2. Recuento de *W. confusa* en los diferentes tratamientos evaluados durante 5 semanas de almacenamiento a 4°C.

Los chips se empaquetaron en un empaque con permeabilidad alta a vapor de agua (4,4 - 4,9 g/m²/h/atm), por lo cual presentaron aumento sustancial de la a_w durante las 5 semanas de almacenamiento (figura 3), en un promedio de 0,6 a 0,8. Esto se puede explicar por un fenómeno que le ocurre al chocolate llamado cristalización (llamado también "Bloom"), donde se libera agua y la actividad de agua podría aumentar (Vercet, 2003), este aumento en la actividad de agua podría tener incidencia en la textura del chip. Katz y Labuza (1981) muestran que un incremento en la actividad de agua de 0.4 a 0.45, podría inducir a una pérdida de dureza en alimentos con bajo contenido de humedad, además de proliferación de hongos y levaduras, que influyen en el deterioro del alimento (Beuchat, 2002).

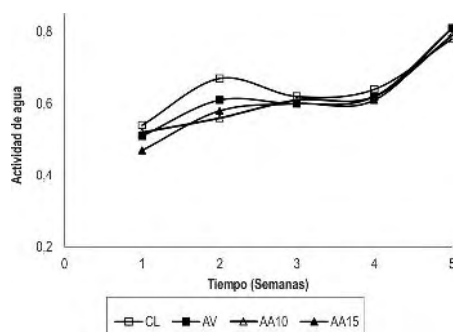


Figura 3. Actividad de agua de chips de cobertura de chocolate durante el almacenamiento a 4°C en un empaque de poliamida con permeabilidad de 4,4 - 4,9 g/m²/h/atm.

Uno de los criterios importantes para la selección de un probiótico es su capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés causado por bajo o alto pH (Cook *et al.*, 2012); este es el caso del tracto gastrointestinal. En la tabla 2, se presentan el número de microorganismos probióticos que lograron sobrevivir en los chips de chocolate, después de 5 semanas de almacenamiento y después de estar sometidos a 2 horas en un sistema simulado de jugos intestinales (pH 8,0). Todos los tratamientos presentaron tolerancia a las sales biliares, presentando reducciones, iguales o menores, de una unidad logarítmica. Este mismo comportamiento se presentó en los resultados de Lee *et al.* (2012) quienes mostraron reducción de 1 unidad logarítmica ($5,6 \times 10^{10}$ a $7,2 \times 10^9$ UFC/g) al evaluar el mismo microorganismo (*W. confusa*) en las mismas condiciones del presente estudio. La concentración empleada en este estudio (0,3 % de sales biliares) se considera que es una concentración crítica utilizada para la selección de cepas resistentes (Gilliland *et al.*, 1984). Se conoce que las grasas son moléculas hidrofóbicas que necesitan la acción de sales biliares para su absorción, ya que las sales biliares presentan una región hidrofóbica que interactúa con los glóbulos de grasa, y una región hidrofílica que se orienta hacia el medio acuoso, permitiendo la acción de enzimas como las lipasas pancreáticas que

hidrolizan la grasa en ácidos grasos y monoglicéridos para su posterior absorción en el intestino delgado, de esta manera permitir la disminución del colesterol sérico (Manzano *et al.*, 2012). Tanto las sales biliares como las lipasas son de pH alcalino, por lo cual con los resultados se puede afirmar que tanto la matriz de chocolate como el probiótico *W. confusa*, son aptos para el diseño de productos probióticos en fase sólida ya que resisten el almacenamiento, y permanecen vivos al paso por el intestino delgado. La resistencia al paso de sales biliares es uno de los criterios para que un producto se considere probiótico.

Tabla 2. Recuento de *W. confusa* en chips de cobertura de chocolate sometidos a sistema simulado de jugos intestinales.

Tiempo	Tratamiento (UFC/g)			
	CL	AV	AA10	AA15
t=0 min	7,45x10 ⁷	2,10x10 ⁸	1,96x10 ⁷	1,30x10 ⁶
t=120 min	8,15x10 ⁶	1,34x10 ⁸	4,90x10 ⁶	1,28x10 ⁶

Conclusiones

La cobertura de chocolate y la bacteria ácido láctica *W. confusa*, son idóneos para el desarrollo de productos probióticos en matrices sólidas. Los chips de cobertura de chocolate mantienen su condición de probióticos por lo menos durante 5 semanas ya que permanecieron vivos más de 10^6 microorganismos por gramo de producto. La actividad de agua aumento para todos los tratamientos, lo que sugiere, emplear un empaque con menor transmisión de vapor de agua y almacenar a condiciones de humedad relativa baja. La incorporación de *W. confusa* encapsulada y libre a una matriz de cobertura de chocolate presenta resistencia al medio intestinal, siendo los tratamientos AV y AA15 los que presentan menor pérdida de viabilidad.

Agradecimientos

Se agradece al programa "Jóvenes investigadores e innovadores 2012" de COLCIENCIAS.

Referencias bibliográficas

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixido, N., Usall, J., y Vinas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the bio-control yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65(3), 173-182.
- Aragon-Alegro, L.C., Alarcon Alegro, J.H., Cardarelli, R.H., Chih Chiu, M. y Isay Saad, S.M. (2007). Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 669-675.
- Ayeni, F.A., Sánchez, B., Adeniyi, B.A., De Los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. y Ruas-Madiedo, P. (2011). Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's

- intestine. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 97–104.
- Beuchat, L.R. (2002). Water activity and microbial stability. Fundamentals of water activity. IFT Continuing Education Committee. Anaheim, CA. 14-15.
- Botelho, P.B., Galasso, M., Dias, V., Mandrioli, M., Lobato, L.P., Rodriguez-Estrada y M.T., Castro, I.A. (2014). Oxidative stability of functional phytosterol-enriched dark chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 444–451.
- Brinques, G.B., y Ayub, M.A.Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103(2), 123–128.
- Brudzynski, K. (2007). Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities materials and methods of Canadian Honeys". *Canadian Journal of Microbiology*, 52(12), 1228–1237.
- Burgain, J, Gaiani, C., Linder, M. y Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104(24), 467–483.
- Christopher M, Reddy V. y Venkateswarlu K. (2009). Viability during storage of two *Bifidobacterium bifidum* strains in set and stirred flavoured yoghurts containing whey protein concentrates. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(1), 25-31.
- Cueto, C., y Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*, 3(1), 45–50.
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., y Khutoryanskiy, V.V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 162(1), 56–67.
- Da Silva S. M. (2011). Incorporation of probiotics in cereal bars: Technological viability and stability. [MSc. Tesis social Communication]. Braga (Portugal): Universidade Católica Portuguesa. Escola Superior de Biotecnología. 4 p.
- De Man J.C., Rogosa M. y Sharpe, M. E. A. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
- FAO/WHO. Food and agriculture organization/ World Health Organization. (2001). Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. p. 1–34. Recuperado de: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>.
- Foerst, P., Kulozik, U., Schmitt, M., Bauer, S., y Santivarangkna, C. (2012). Storage stability of vacuum-dried probiotic bacterium *Lactobacillus paracasei* F19. *Food and Bioproducts Processing*, 90(2), 295–300.
- Gilliland, S.E, Staley, T.E y Bush, I.J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67(12), 3045-3051. DOI: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81670-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81670-7).
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M.R., Yarmand, M.S., y Razavi, S.H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55.
- Jankovic, I.; Sybesma, W.; Phothirath, P.; Ananta, E., y Mercenier, A. 2010. Application of probiotics in food products – Challenges and new approaches. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 175-181.
- Katz, E.E. y Labuza T.P. (1981). Effect of water activity on the sensory crispness and mechanical deformation of snack food products. *Journal Food Science*, 46(2), 403–409. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1981.tb04871.x.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., y Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13.
- Lahtinen, S.J., Ouwehand, C., Salminen, S.J., Forsell, P., y Myllärinen, P. (2007). Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 44(5), 500–505.
- Lee, K.W., Park, J.Y., Jeong, H.R., Heo, H.J., Han, N.S., y Kim, J.H. (2012). Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. *Anaerobe*, 18(1), 96 – 102.
- Malmo, C., Storia, A., y Mauriello, G. (2011). Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Cells Coated in Alginate Beads with Chitosan by Spray Drying to Use as a Probiotic Cell in a Chocolate Soufflé. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 795–805.
- Manzano C., Estupiñán D.G. y Poveda E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: Que dice la evidencia científica. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1), 98–110.
- Nam, H., Ha, M., Bae, O. y Lee, Y. (2002). Effect of *Weissella confusa* Strain PL9001 on the Adherence and Growth of *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4642-4645.
- Nebesny, E., Żyżelewicz, D., Motyl, I., y Libudzisz, Z. (2007). Dark chocolates supplemented with *Lactobacillus* strains. *European Food Research and Technology*, 225(1), 33–42.
- Ouwehand, A.C., Kurvinen, T., y Rissanen, P. (2004). Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an in vivo study. *International journal of food microbiology*, 95(1), 103–106.
- Pehkonen, K.S., Roos, Y.H., Miao, S., Ross, R.P., y Stanton, C. (2008). State transitions and physicochemical aspects of cryoprotection and stabilization in freeze-drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). *Journal Applied Microbiology*, 104(6), 1732–1743.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W. y Van De Wiele, T. (2010). Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), 97–103.
- Ranadheera, R. D. C. S.; Baines, S.K., Adams, M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, 43(1), 1-7.
- Rivera-Espinoza, Y. y Gallardo-Navarro, Y. (2010). Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology*, 27(1), 1-11.
- Serna L., Valencia, L.J. y Campos, R. (2010). Cinética de fermentación y acción probiótica de *Weissella confusa* contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*, 55, 53-63.
- Serna-Cock, L., Vallejo-Castillo, V.E. y García-Gonzalez, E. (2012). Gel de Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) en la encapsulación de una bacteria ácido láctica. *Vitae*, 19(1), S168-S170.
- Vercet, A. 2003. Browning of white chocolate during storage. *Food Chemistry*, 81(3), 371–377.
- Weinbreck, F., Bodnár, I. y Marco M.L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 364–367.