

Optimización de pasteurización y tiempo de incubación en la elaboración de queso keferinado fortificado con esteroides vegetales

**Samantha Abigail Proaño Pacheco
Krystina Alejandra Lema Almeida**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Optimización de pasteurización y tiempo de incubación en la elaboración de queso keferinado fortificado con esteroides vegetales

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingenieras en Agroindustria Alimentaria en el Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

**Samantha Abigail Proaño Pacheco
Krystina Alejandra Lema Almeida**

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2015

Optimización de pasteurización y tiempo de incubación en la elaboración de queso keferinado fortificado con esteroides vegetales

Presentado por:

Samantha Abigail Proaño Pacheco
Krystina Alejandra Lema Almeida

Aprobado:

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria

Juan Antonio Ruano, D.Sc.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Optimización de pasteurización y tiempo de incubación en la elaboración de queso keferinado fortificado con esteroides vegetales

**Samantha Abigail Proaño Pacheco
Krystina Alejandra Lema Almeida**

Resumen: Las tendencias de consumo de alimentos naturales y funcionales promueven la innovación de productos. El kéfir es un cultivo láctico natural reconocido por sus excelentes propiedades nutricionales y terapéuticas, así mismo el fitosterol es un compuesto de origen vegetal capaz de reducir el colesterol sanguíneo. El presente trabajo tuvo como finalidad desarrollar un flujo de proceso para un queso keferinado combinando temperaturas de pasteurización y tiempos de incubación, optimizarlo mediante la Metodología de Superficie de Respuesta y evaluar el producto con y sin adición de fitosterol. Dos fases fueron utilizadas, en la primera las variables que resultaron significativas con una $P < 0.10$ fueron purga, rendimiento, pH, color a^* y viscosidad, determinando así 90 °C de temperatura de pasteurización y 20 horas de incubación como tratamiento óptimo. En la segunda fase se elaboró el queso con el tratamiento óptimo y se le agregó 0.75 g de fitosterol esterificado con aceite de oliva en 30 g de producto. Se realizaron los mismos análisis de la primera fase incluyendo un análisis proximal al día cero, un análisis sensorial discriminatorio y de preferencia y un análisis de costos variables. Los quesos con y sin fitosterol no tuvieron diferencias en el análisis sensorial, sin embargo, en el análisis proximal el contenido graso del queso con fitosterol aumentó en 2.74% (6.45 vs. 3.71%) y su costo para una presentación de 450 g duplicó al queso sin fitosterol (L.40.01 vs. L.19.97), debido al aceite de oliva añadido.

Palabras clave: Cromatografía, fitosterol, kéfir, leche fermentada, superficie de respuesta.

Abstract: Consumer trends of natural and functional foods promote product innovation. Kefir is a natural lactic culture known by its excellent nutritional and therapeutic properties, as well phytosterol is a vegetal compound able to reduce blood cholesterol. The purpose of this study was to develop a process flow for a kefir cheese combining pasteurization temperatures and incubation times, optimizing it with Response Surface Methodology and assess this product with and without phytosterol additions. Two phases were evaluated, in the first phase the significant variables using a $P < 0.10$ were purge, yield, pH, color a^* , and viscosity. It was established 90 °C for the pasteurization temperature and 20 hours for the incubation time as the optimal treatment. In the second phase it was elaborated the cheese with the optimal treatment and then it was added 0.75 g of phytosterol esterified with olive oil by 30 g of product. Same analyses done in the first phase were performed, including a proximal analysis at day zero, a discriminatory and a preference sensory analysis and variable costs analysis. Cheeses with and without phytosterol did not presented statistical differences for the sensory analyses, however, in the proximal analysis it was observed that fat content in the cheese with phytosterol increased 2.74% (6.45 vs. 3.71%) and its costs for a 450 g presentation duplicated the cheese without phytosterol (L.40.01 vs. L.19.97), due to the olive oil added.

Keywords: Chromatography, fermented milk, kefir, phytosterol, response surface.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
4. CONCLUSIONES	33
5. RECOMENDACIONES	34
6. LITERATURA CITADA.....	35
7. ANEXOS	40

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción del diseño experimental.....	4
2. Niveles de las variables independientes.	4
3. Delineamiento del diseño experimental completo.	5
4. Método de cálculo de análisis de varianza.	6
5. Condiciones cromatográficas empleadas para cuantificar esteroles vegetales en queso.....	9
6. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R ² para la variable purga en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.....	11
7. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R ² para la variable rendimiento en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.....	13
8. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R ² para la variable pH en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.....	15
9. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R ² para la variable color a* en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.....	17
10. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R ² para la variable viscosidad a en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.....	18
11. Promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables grasa y ATECAL del queso keferinado.	22
12. Promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables de color del queso keferinado.	24
13. Promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables de color y viscosidad del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol.....	25
14. Análisis proximal del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol al día cero. ...	27
15. Tiempos de elusión y áreas de pico en la cromatografía de esteroles vegetales para queso keferinado óptimo con y sin fitosterol.....	29
16. Evaluación de ATECAL y purga del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol en el tiempo.	31
17. Costos variables del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol en presentaciones de 230 y 450 gramos.	32

Figura	Página
1. Flujo de proceso de queso keferinado fortificado con esteroides vegetales.....	7
2. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en la cantidad de purga del queso keferinado.....	12
3. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en el rendimiento del queso keferinado.....	14
4. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en el pH del queso keferinado.	16
5. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en el color a* del queso keferinado.	17
6. Reograma del queso keferinado.	18
7. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en la viscosidad a 100 rpm del queso keferinado.	19
8. Función de utilidad para la optimización del queso keferinado.	20
9. Reograma del queso keferinado óptimo al día cero con y sin fitosterol.	26

Anexos	Página
1. Viscosidad de queso keferinado al día cero para todos los tratamientos. Temperatura promedio: 23-24 °C.....	40
2. Valores F calculado P= 0.10 para las variables purga, rendimiento, pH, color a* y viscosidad.	40
3. Tabla de puntos de porcentaje de la distribución F (P= 0.10).	41
4. Boleta para evaluación sensorial de discriminación dúo- trío.....	42
5. Boleta para evaluación sensorial afectiva de preferencia.....	42
6. Datos demográficos (género, edad, nacionalidad) del análisis sensorial de discriminación dúo- trío.	43
7. Datos demográficos (género, edad, nacionalidad) del análisis sensorial afectivo de preferencia.	44
8. Tabla de valores críticos para Chi-cuadrado.	45
9. Cromatogramas de queso keferinado con fitosterol.	46
10. Cromatogramas de queso keferinado sin fitosterol.	47

1. INTRODUCCIÓN

Una nutrición adecuada implica el consumo de alimentos que satisfagan las necesidades de cada organismo y que comprenda una dieta que incluya diferentes grupos de alimentos en cantidad y calidad suficientes para reducir el riesgo de enfermedades, mejorar el desarrollo físico y mental, incrementar la respuesta inmunológica y mantener una vida saludable (OMS 2015). Parte de esa nutrición la proporciona la ingesta de leche y productos lácteos derivados.

Los humanos dependemos de la leche materna durante los primeros meses de vida, sin embargo, ésta va reduciendo su valor nutricional por lo que tienen que incluirse alimentos que la complementen y posteriormente la sustituyan. La leche de vaca reemplaza el consumo de leche materna, con la domesticación del ganado vacuno, ésta constituye una parte importante en la dieta del hombre y dado su alto valor nutricional ha sido denominada como el alimento casi perfecto (Gómez y Bedoya 2005). La composición de la leche varía según la raza de la vaca, su alimentación y la época del año, aunque se mantiene relativamente constante: 88% de agua, 4.7% de lactosa, 3.5% de proteína, y 3.7% de grasa, también contiene alrededor de 1% de minerales como el calcio y fósforo y vitaminas A, D y E (Romero y Mestres 2004).

El descubrimiento accidental y la experiencia de consumo de las leches fermentadas permitió descubrir que éstas eran mejor digeridas y más toleradas por las personas. A partir de esto se originaron quesos, yogures, cuajadas y también el kéfir (Gálvez 2012). El kéfir proviene de la región del Cáucaso en Europa, en donde tenían la cultura de modificar la leche a queso y yogur por medio del cuajo extraído de animales lactantes; este residuo vivo que quedaba adherido a las paredes de los recipientes usados les permitía fermentar la nueva tanda de una manera más rápida y sin la necesidad de usar cuajo del mamífero (Calvente 2009).

El kéfir es una asociación simbiótica de bacterias probióticas (lactobacilos y acetobacterias) y levaduras en forma de gránulos, estos microorganismos fermentan la leche en condiciones de higiene aportando propiedades conservadoras que frenan a los microorganismos responsables de la degradación. Durante este proceso los gránulos de kéfir cambian a la leche normal en leche keferinada a través de una fermentación lacto-alcohólica, produciendo ácido láctico, etanol, ácido acético y dióxido de carbono (Gálvez 2012). La leche keferinada es parecida en apariencia a un yogur casero; entre sus propiedades nutricionales y terapéuticas están: retardar el cáncer de mama, restablecer la flora intestinal, incrementar el valor biológico y asimilación de la caseína a través de su desnaturalización y desdoblar la lactosa en glucosa y galactosa permitiendo que personas lacto-intolerantes puedan consumirla (Conis 2008).

La leche entera contiene 14 mg de colesterol, la leche semidescremada 8 mg y la leche descremada 5 mg por cada 100 g (USDA 2015). Los productos lácteos contienen una cantidad significativa de colesterol que con alto consumo aumentan la concentración del mismo en la sangre y con esto, la probabilidad de sufrir de enfermedades cardiovasculares. Uno de los objetivos de los alimentos funcionales es mejorar o agregar compuestos a los alimentos para favorecer el perfil lipídico del organismo, reduciendo los niveles de colesterol, triglicéridos y ácidos grasos saturados y aumentando los ácidos grasos mono y poliinsaturados (Sanclemente *et al.* 2012).

Los esteroides vegetales o fitosteroides se consideran componentes funcionales por su actividad hipocolesteromiante, lo cual disminuye los niveles de colesterol de baja densidad (LDL) plasmático entre un 10 y 15%. Gracias a esto y a otros estudios realizados, la Unión Europea ha permitido su uso en grasas para untar, leches fermentadas, bebidas de soya, bebidas de fruta a base de leche y quesos (Conchillo *et al.* 2005). Los fitosteroides son componentes estructurales y funcionales de las membranas de las células vegetales con una estructura química similar al colesterol pero con pequeñas variaciones en la cadena hidrocarbonada lateral, esto genera una absorción de colesterol ineficiente a nivel intestinal dado la competencia entre ambos (Jones *et al.* 1997), además reducen la reesterificación del colesterol en los enterocitos por inhibir la actividad de la enzima *acilCoA-Colesterol Acyl Transferasa* (ACAT) o aumentan la actividad y expresión del transportador tipo ABC que acelera el eflujo de colesterol desde las células intestinales al lumen intestinal (Plat *et al.* 2000).

En una dieta habitual, las personas consumen de 150 a 400 mg de fitosteroides diarios y solo los vegetarianos o con dieta japonesa pueden alcanzar de 500 a 1000 mg/día. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha establecido que si se añade al menos 1 g/día de fitosterol, en forma de suplemento, se puede reducir el colesterol LDL entre un 10 y un 14%, sin embargo, un exceso del mismo puede reducir el nivel plasmático de beta-carotenos y en menor proporción de vitamina A y vitamina D, por lo cual no es recomendable sobrepasar 3 g/día (Plaza 2001). Su ingesta se restringe en particular a mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o a niños menores de cinco años (Hidalgo 2004). Los principales fitosteroides funcionales son el beta-sitosterol, campesterol y estigmasterol y se encuentran en aceites vegetales, semillas, frutos secos, legumbres, productos concentrados, extractos y suplementos nutricionales (Sanclemente *et al.* 2012).

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Desarrollar una formulación y un flujo de proceso de un queso elaborado con leche kefirizada fortificado con esteroides vegetales.
- Establecer el nivel óptimo de la temperatura de pasteurización y el tiempo de incubación de los gránulos de kéfir para obtener un queso con las propiedades fisicoquímicas deseadas utilizando un modelo matemático de superficie de respuesta.
- Comparar sensorialmente el tratamiento óptimo con y sin esteroides vegetales a través de una prueba afectiva de preferencia y una prueba de discriminación.
- Determinar los costos variables del tratamiento óptimo con y sin fitosterol.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. La investigación se realizó en la Planta de Procesamiento de Lácteos y el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, localizada en el km 32 al Este de Tegucigalpa, Departamento de Francisco Morazán, Honduras, C.A.

Materiales. Se obtuvo leche estandarizada al 2% de grasa de la Planta de Procesamiento de Lácteos de Zamorano a 4 °C y con un ATECAL de 0.14- 0.15%. Los análisis de acidez se validaron con el método AOAC 920.124 y el de grasa con el método de Babcock AOAC 989.04. El cultivo láctico kéfir fue extraído de un cultivo madre seleccionado en Sangolquí, Ecuador y transportado a Zamorano en un medio aeróbico a temperatura ambiente. El esteroil vegetal Beta Sitosterol (Plant Sterol) Pure Powder fue adquirido a través de una compra en línea en Bulk Supplements¹.

Pruebas Preliminares. Se elaboró queso utilizando leche estandarizada al 2% de grasa con cuatro tratamientos térmicos: 75 °C durante 15 segundos, 85 °C durante 15 segundos, 85 °C durante 30 minutos y 95 °C durante 30 minutos. Se tomó 1.0 L de leche de cada tratamiento y se incubaron 40, 50, 60 o 70 g de kéfir por 18, 20, 22, 24 o 36 horas a una temperatura de 28-29 °C. A partir de estas pruebas se estableció que las mejores características físicas en cuanto a viscosidad del queso se obtuvieron con las leches con mayor tratamiento térmico (85 °C/ 30 minutos y 95 °C/ 30 minutos) con 50 g de kéfir, lo que permitió establecer los puntos centrales del diseño experimental.

Diseño experimental (Primera fase). El diseño experimental empleado fue el método de Superficie de Respuesta con un diseño de composición central rotacional de segundo orden. Este método incluye técnicas matemáticas y estadísticas que permiten modelar problemas en donde las variables de interés son influenciadas por otras (Gutiérrez y De la Vara 2008). Las variables del proceso fueron codificadas (-1, 0, +1), según la ecuación:

$$x_i = X_i - \frac{Z}{\Delta x_i} \quad [1]$$

Dónde:

x_i = Valor codificado de la variable X_i

X_i = Valor real de la variable

Z = Valor real de la variable en el punto central

Δx_i = Valor del intervalo de variación de x_i

¹ Compra en línea, disponible en: <http://www.bulksupplements.com/phytosterol-beta-sitosterol.html>

Se delinearon las variables axiales $-\alpha$ y $+\alpha$ de acuerdo al número factorial ($F = 2^k$), donde k fue el número de variables independientes ($k = 2$), los valores fueron definidos por la ecuación:

$$\alpha = F^{1/4} = (2^k)^{1/4} = 1.414 \quad [2]$$

El número de unidades experimentales que formaron el diseño factorial completo se calcularon según la ecuación:

$$n = 2^k + 2k + m \quad [3]$$

Dónde:

2^k = número de puntos factoriales

$2k$ = número de puntos axiales

m = número de réplicas del punto central

Se usaron dos variables independientes y dos niveles codificados para un total de 13 unidades experimentales, siendo cuatro factoriales -1 y $+1$, cuatro axiales $-\alpha$ y $+\alpha$ y cinco puntos centrales que sirvieron como estimado del error experimental y determinación de la precisión del modelo matemático (Cuadro 1).

Cuadro 1. Descripción del diseño experimental.

Expresión	Cantidad de puntos
$2^k = 2^2$	4 Factoriales
$2k = 2 \times 2$	4 Puntos axiales
m	5 Puntos centrales
	13 Unidades experimentales

Los niveles de las variables independientes resultaron de la combinación de todos los niveles factoriales, axiales y centrales utilizados (Cuadro 2).

Cuadro 2. Niveles de las variables independientes.

Niveles	Temperatura de pasteurización(°C) X₁	Tiempo de incubación (h) X₂
$-\alpha$	84.34	17.18
-1	86.00	18.00
0	90.00	20.00
1	94.00	22.00
$+\alpha$	95.66	22.83

El análisis de los resultados del modelo experimental se realizó a través de una ecuación en donde se combinaron las dos variables independientes y una variable dependiente, siendo la respuesta una función de los niveles combinados. Se realizó un análisis de regresión al polinomio de segundo orden para cada variable dependiente con una ecuación general:

$$Y_i = (\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon) \quad [4]$$

Dónde:

- Y_i = Función respuesta
- X_1 y X_2 = Valores de las variables independientes
- β_0 = Coeficiente relativo con la interpretación del eje
- β_1 y β_2 = Coeficientes lineales estimados por el método de mínimos cuadrados
- β_{11} y β_{22} = Coeficientes de variables cuadráticas
- β_{12} = Coeficiente de interacción entre variables independientes
- ε = Error experimental

Los coeficientes en el modelo del polinomio de segundo orden fueron ajustados según los resultados obtenidos en el diseño experimental. El delineamiento del diseño experimental es la representación completa de todas las variables independientes codificadas y decodificadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Delineamiento del diseño experimental completo.

Tratamiento	Niveles de variables codificadas		Niveles de variables decodificadas	
	A	B	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
1	-1	-1	86.00	18.00
2	-1	1	86.00	22.00
3	1	-1	94.00	18.00
4	1	1	94.00	22.00
5	-1.414	0	84.34	20.00
6	1.414	0	95.66	20.00
7	0	-1.414	90.00	17.17
8	0	1.414	90.00	22.83
9	0	0	90.00	20.00
10	0	0	90.00	20.00
11	0	0	90.00	20.00
12	0	0	90.00	20.00
13	0	0	90.00	20.00

La significancia de los coeficientes estimados en el modelo ajustado se comprobó con un análisis de varianza de los datos (Cuadro 4). Para considerar al modelo predictivo el estadígrafo calculado se comparó con el F tabular a un 10% de nivel de significancia; si F calculada > F tabular entonces el modelo resultó significativo, además se hizo un análisis

de ajuste del modelo con R^2 (proporción total de la variación de las observaciones con respecto a su media) en donde se esperó que sea mayor a 0.60 y se evaluó que la falta de ajuste no fuese significativa.

Cuadro 4. Método de cálculo de análisis de varianza.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F calculada	F tabular
Regresión	SSR	$p - 1$	$\frac{SSR}{p - 1}$	$\frac{SSR}{p - 1}$	$F(p-1, N-p)$
Residuo	SSE	$N - p$	$\frac{SSE}{N - p}$	$\frac{SSE}{N - p}$	
Total	SST	$N - 1$			

p : número de términos del modelo ajustado.

Análisis Estadístico. El procesamiento de los datos se realizó con el programa STATISTICA versión 7.0 usando las variables independientes codificadas para la obtención de los coeficientes de regresión y análisis de varianza; y las variables decodificadas para la generación de las superficies de respuesta. Para las variables que no fueron significativas (no cumplieron con los tres parámetros antes mencionados) se realizó una separación de medias ajustadas con LSmeans y un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia del 5%, utilizando el programa “Statistical Analysis System” (SAS[®] versión 9.3).

Pasteurización de la leche. La leche se pasteurizó en una marmita durante 30 minutos a las temperaturas que indica el Cuadro 3. Se dejó enfriar y se envasó para su posterior almacenamiento a 4 °C.

Elaboración de queso a partir de kéfir. Se mezcló 1.0 L de leche pasteurizada al 2% de grasa y con 0.14-0.15% de ATECAL a 28-29 °C con 50 g de kéfir, se añadió 0.01% de cuajo y se incubó a 28-29 °C a cinco tiempos de incubación según indica el Cuadro 3. Después de la incubación se colocó el queso en un colador plástico para eliminar el suero, retener el queso y retirar los gránulos de kéfir, se añadió 1% de sal y 0.1% de sorbato de potasio con respecto a la cantidad de queso obtenida.

Adición de fitosterol al queso. Se estableció el mejor tratamiento según el diseño experimental y se añadió 0.86 g de fitosterol (87% pureza) por cada 28.28 g de queso. El fitosterol fue disuelto en aceite de oliva extra virgen en una proporción de 1:1 dado sus propiedades hidrofóbicas (Kutney *et al.*, 2005) y posteriormente se incorporó al queso, obteniendo una concentración final de 0.75 g de fitosterol por 30 g de producto.

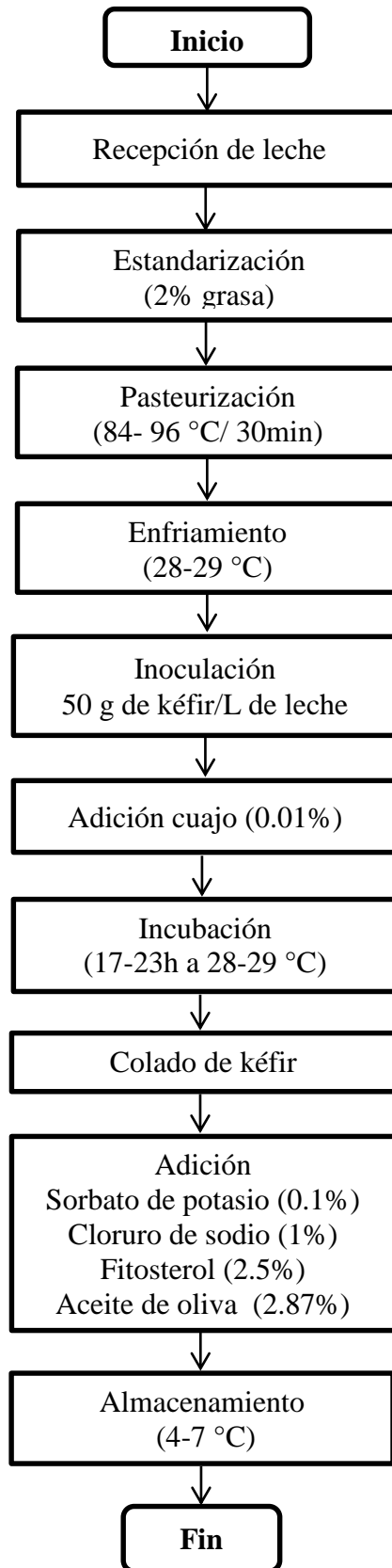


Figura 1. Flujo de proceso de queso keferinado fortificado con esteroides vegetales.

Determinación de purga. Se coló el queso después de la incubación y con un Erlenmeyer graduado se midió la cantidad de suero de leche (purga) que desprendió, el porcentaje de purga se determinó en base a la cantidad de leche inoculada.

Determinación de rendimiento. Se coló el queso para separarlo del kéfir y suero de leche. Se pesó en una balanza y su porcentaje de rendimiento se determinó en base al peso de leche inoculada.

Análisis de grasa. Se midió el contenido graso al día cero de cada tratamiento pesando 9 g de queso en un butirómetro y añadiendo 10 mL de agua hirviendo, se procedió con el método de Babcock AOAC 989.04.

Análisis de ATECAL. Se estimó la acidez de cada queso al día cero, mezclando 9 g de queso con 9 mL de agua destilada, después se extrajeron 9 mL de la solución y se añadieron seis gotas de fenolftaleína, la acidez fue medida con el método AOAC 920.124.

Análisis de pH. El pH de cada muestra fue medido al día cero y por triplicado usando el método estándar AOAC 981.12, con un potenciómetro HM digital PH-200 calibrado con soluciones buffer de cuatro y siete.

Análisis de color. Se evaluó el color del queso al día cero y por triplicado con el instrumento Hunter L* a* b* modelo 45/0 calibrado y su software (ASTM D6290). Para cada tratamiento los resultados se presentaron en una escala de triple estímulo (L* a* b*), donde L* va de 0 siendo color negro y 100 siendo color blanco, a* que va de -60 a 0 para el color verde y de 0 a +60 para el color rojo y b* de -60 a 0 para el color azul y 0 a +60 para el color amarillo. Con base a estos valores se determinó el índice de blancura de cada tratamiento usando el método ASTM E313.

Análisis de viscosidad. Se determinó la viscosidad del queso al día cero con el Reómetro Brookfield DV-III Ultra V6.1 LV spindle LV4 según el método descrito en ISO 1652:2004. En un vaso de precipitación se colocaron 200 mL de queso, se evaluó por triplicado a 100, 125 y 150 rpm de manera ascendente y descendente. Los análisis fueron realizados a 23-24 °C y sus resultados fueron reportados en Pa.s.

Análisis microbiológico. Se realizó un conteo de coliformes con la técnica de vaciado en placa. Se diluyeron 5 g de queso al día cero en 25 mL de agua peptonada y se colocó 1 mL de esta solución en un plato Petri previamente esterilizado, se añadió aproximadamente 30 mL de medio de cultivo selectivo Violeta Rojo y Bilis Agar (VRBA) y se incubó a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Cada tratamiento se evaluó por duplicado y los resultados se expresaron en UFC/g.

Segunda fase. A partir de los resultados obtenidos en la primera fase se determinó la combinación óptima de la temperatura de pasteurización de la leche y el tiempo de incubación del cultivo para la elaboración del queso keferinado, se compararon dos quesos, uno sin adición de fitosterol y otro con 0.75 g de fitosterol por cada 30 g de producto. A ambos tratamientos se les realizó las pruebas mencionadas anteriormente, además las que se detallan a continuación.

Análisis proximal. Se hizo un análisis proximal al queso con y sin fitosterol al día cero. Se midió el contenido de humedad por horno de convección usando el método AOAC 952.08, grasa con el método de Soxtec AOAC 991.36, proteína con el método AOAC 955.04, cenizas usando incineración en seco y con el método AOAC 923.03, fibra cruda con el método AOAC 962.09, actividad de agua con el AquaLab usando el método AOAC 978.18 y por diferencia se estimó la cantidad de carbohidratos presente. Se realizó una separación de medias con el método de Duncan con 5% de significancia.

Determinación de esteroides vegetales. Se determinó la concentración de fitosteroides usando un método adaptado al reportado por Bañuls (2012), siguiendo el siguiente procedimiento:

- **Extracción de grasa.** La muestra de queso se sometió a hidrólisis ácida utilizando HCl 4N y su contenido lipídico se extrajo con el método de Soxtec AOAC 991.36.
- **Saponificación.** La grasa obtenida fue redisolta en 6 mL de hexano y evaporada en un rotavapor (120 rpm a 70 °C) hasta obtener aproximadamente un volumen de 2 mL, se adicionó 1 mL de KOH 2M en metanol y se agitó en un vórtex durante 30 segundos. La mezcla se calentó en baño maría a 65 °C durante una hora y después de enfriar se agregó 1 mL de agua destilada y 3 mL de hexano, la solución fue transferida a tubos de ensayo donde se agitó un minuto en un vórtex.
- **Derivatización.** Se centrifugaron las muestras a 1800 rpm por cinco minutos, el insaponificable fue filtrado con una jeringa de 0.45 µL y transferido a un balón. La solución se calentó a 65 °C durante una hora en baño maría y una vez frío el residuo fue redisolto en 100 µL de trimetilclorosilano y 0.5 mL de dimetilformamida.

Cromatografía de gases. Se inyectó 1.0 µL de la solución en el cromatógrafo de gases con específicas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Condiciones cromatográficas empleadas para cuantificar esteroides vegetales en queso.

Fases	Condiciones
Modo Split	97.8:1
Gas Portador	Hidrógeno, flujo: 301 mL/ min
Condiciones del Inyector	°T: 300°C, presión:10 psi, flujo H ₂ : 301 mL/min
Condiciones de la Columna	HP- 5 5% Phenyl Methyl Siloxane presión:10 psi, flujo: 0.3 mL/min
Condiciones del Horno	°T inicial:150 °C (3 min) Rampa 1: 30 °C/min hasta alcanzar 280 °C (23 min) Rampa 2: 10 °C/min hasta alcanzar 295 °C (10 min)
Condiciones del Detector	°T: 300 °C, flujo H ₂ : 35 mL/min, flujo aire: 280 mL/min
Tiempo total	42 min aproximadamente

Fuente: Bañuls 2012; adaptado por las autoras.

Análisis sensorial. Se evaluó sensorialmente el queso con y sin fitosterol en el día cero. Se realizó una prueba discriminativa de dúo-trío a 50 personas y posteriormente una prueba afectiva de preferencia pareada a 100 personas. Ambos análisis fueron analizados con una prueba binomial a 5% de significancia.

Evaluación de ATECAL y purga en el tiempo. Se evaluó cada tres días y en condiciones de almacenamiento (4-7 °C) la concentración de ATECAL y la cantidad de suero (purga) que liberó el queso.

Determinación de costos variables. Se realizó un análisis de costos variables para las presentaciones de 230 y 450 g de queso keferinado con y sin fitosterol. Los resultados fueron expresados en lempiras (L.) y en su equivalente en dólares (USD) con una tasa de conversión actual de L. 22.02 por cada dólar.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Valoración general. Los 13 tratamientos se elaboraron según la metodología descrita previamente utilizando una cepa de kéfir autóctono como cultivo madre iniciador. Se partió de las variables independientes temperatura de pasteurización y tiempo de incubación, y se generaron respuestas sobre las variables de purga, rendimiento, grasa, pH, ATECAL, coliformes, color L*, a*, b*, índice de blancura y viscosidad para luego optimizarlas. La función de respuesta se expresó con una ecuación polinomial ajustada a un polinomio segundo orden.

En primera instancia serán discutidas las variables dependientes que resultaron significativas en el modelo de superficie de respuesta y después a las variables que no resultaron significativas con este método.

Primera Fase.

Análisis de purga y rendimiento. La purga es el suero colectado luego del colado del queso y el rendimiento es la matriz de producto formada a través de la fermentación ácida. Estos parámetros estuvieron inversamente relacionados ya que la purga se redujo de 60-50% (figura 2) mientras que el rendimiento aumentó de 30-70% (figura 3) a medida que la temperatura de pasteurización de la leche en donde se inoculó el cultivo incrementó, sin embargo, el tiempo de incubación no tuvo efecto para ninguna de estas variables.

Cuadro 6. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R^2 para la variable purga en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.

Factor	Coefficiente de regresión	Significancia
Intercepto	6.61E+01	0.000106*
X ₁ : temperatura de pasteurización	-4.24E+00	0.280933
X ₁ ² : temperatura de pasteurización	-8.99E+00	0.069566*
X ₂ : tiempo de incubación	-2.58E+00	0.490668
X ₂ ² : tiempo de incubación	-4.82E+00	0.257736
X ₁ X ₂ : interacción tiempo y temperatura	-1.45E-01	0.977426
		R ² = 0.61

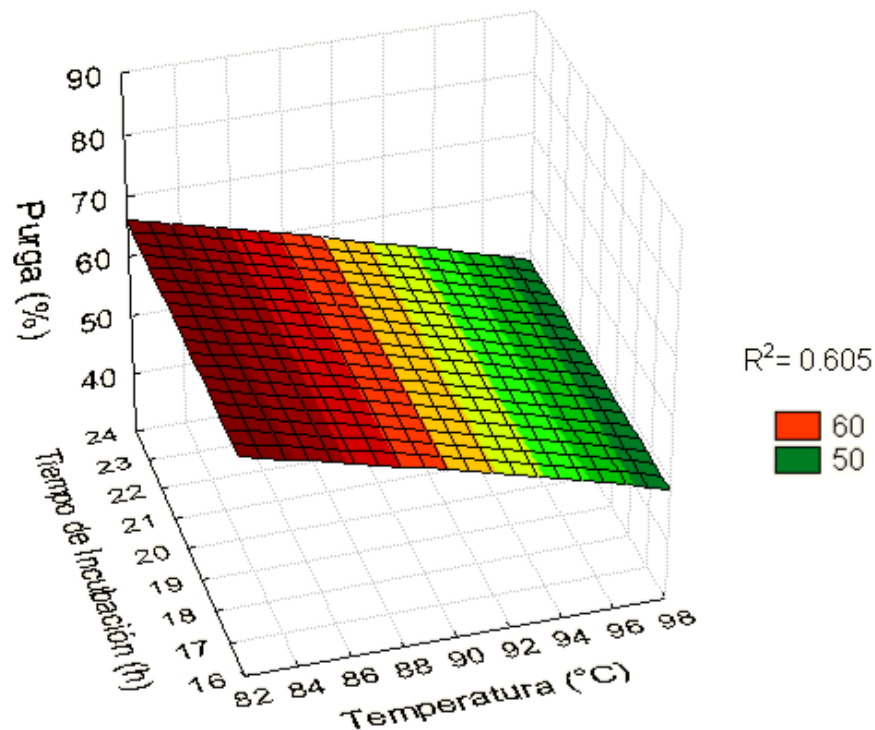
* Factor significativo para una P < 0.10

La expresión matemática que representa la purga (%) es un modelo cuadrático de segundo orden con productos cruzados que son expresados por los coeficientes que fueron significativos (Cuadro 6) según indica la ecuación:

$$\text{Purga (\%)} = 66.052 - 8.991 X_1^2 \quad [5]$$

El R^2 encontrado para la variable purga fue de 0.61, la prueba F con un nivel de significancia del 10% generó un valor F calculado de 7.30 > F tabular 3.23 (Anexo 3) y la falta de ajuste de 0.62 no fue significativa. Por lo descrito, esta variable presentó un comportamiento predictivo ya que cumplió con los tres parámetros.

En la superficie de respuesta generada por el modelo se observó que a mayor temperatura de pasteurización la purga del queso disminuyó independientemente del tiempo de incubación de los gránulos de kéfir (figura 2), a pesar de esto Gutiérrez *et al.* (2003), concluyeron que la sinéresis o purga aumenta significativamente conforme aumenta el tiempo de incubación (24, 36 y 48 horas). La diferencia con el presente estudio se puede atribuir a que el tipo de kéfir utilizado en la inoculación fue un cultivo liofilizado, además el tratamiento térmico fue de 90 °C por 10 minutos lo que incidió directamente en el aumento de la purga, comparándola con los tratamientos térmicos superiores analizados en el presente estudio.



Cuadro 7. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R² para la variable rendimiento en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.

Factor	Coefficiente de regresión	Significancia
Intercepto	2.67E+01	0.001569*
X ₁ : temperatura de pasteurización	6.99E+00	0.064773*
X ₁ ² : temperatura de pasteurización	9.54E+00	0.032258*
X ₂ : tiempo de incubación	2.10E+00	0.490290
X ₂ ² : tiempo de incubación	5.09E+00	0.160640
X ₁ X ₂ : interacción tiempo y temperatura	6.67E-01	0.872636
		R ² = 0.69

* Factor significativo para una P<0.10

La expresión matemática que representa el rendimiento (%) es un modelo cuadrático de segundo orden con productos cruzados que son expresados por los coeficientes que fueron significativos (Cuadro 7) según indica la ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 26.734 + 6.9851 X_1 + 9.5418 X_1^2 \quad [6]$$

El R² encontrado para la variable rendimiento fue de 0.69, la prueba F con un nivel de significancia del 10% generó un valor F calculado de 7.57 > F tabular 2.92 (Anexo 3) y la falta de ajuste de 0.32 no fue significativa. Al cumplir con los tres parámetros antes mencionados esta variable presentó un comportamiento predictivo.

El tratamiento térmico con altas temperaturas es un método de pasteurización ampliamente utilizado para la elaboración de leches fermentadas ya que promueve la producción de ácido láctico desde el principio, lo cual es deseable en este tipo de productos porque genera una textura firme (Zimmermann y Ruiz 2010). En la superficie de respuesta generada se observó que a mayor temperatura de pasteurización el rendimiento del queso fue mayor (figura 3), esto coincidió con lo reportado por Frau *et al.* (2014) cuando obtuvieron una cuajada más débil y delgada con mejor textura, apariencia visual, untabilidad y mayor capacidad de retención de suero al haber aplicado mayores temperaturas de pasteurización.

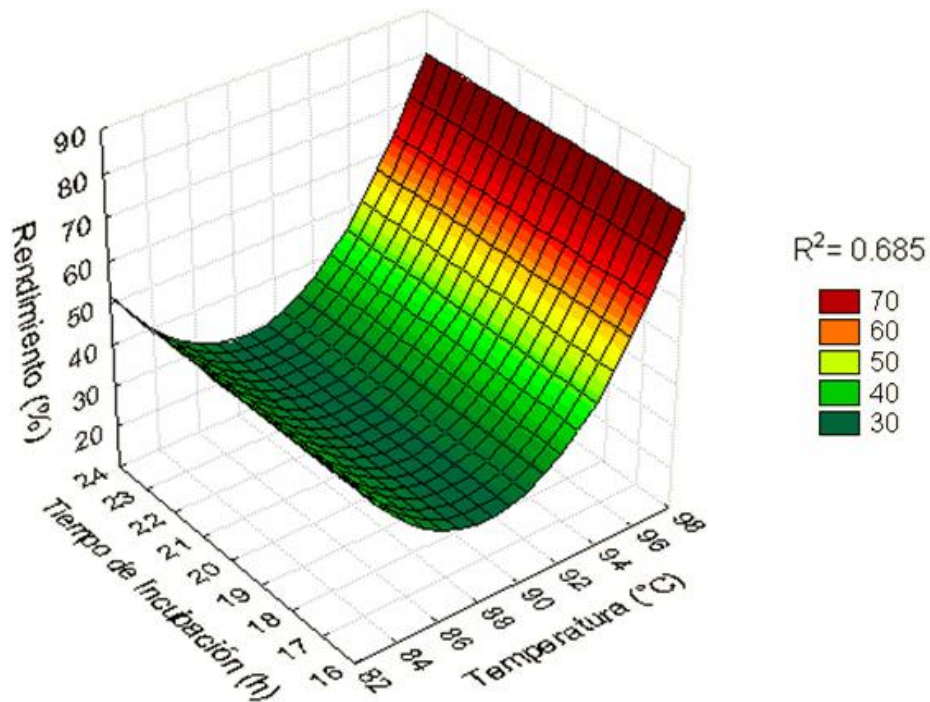


Figura 3. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en el rendimiento del queso kefirado.

La caseína de la leche es una proteína termoestable, mientras que las proteínas del suero no toleran temperaturas por encima de los 65 °C (Rosado y Rosado 2013). Al haber estudiado el efecto de las temperaturas en el queso en un rango superior al tolerable por estas últimas se esperó que se degraden y por tanto alteren su estructura, sin embargo, al obtener una mayor consistencia con el incremento de la temperatura de pasteurización se pudo atribuir que las proteínas del suero se juntaron con las caseínas presentes, lo cual estableció una matriz estable que redujo la pérdida de suero en el colado e incrementó el rendimiento.

Walstra *et al.* (2006), afirmaron que la unión de estas dos proteínas lácteas ocurre por una desnaturalización de las proteínas séricas, en donde el alto tratamiento térmico incrementa y deja expuestos los grupos thiol para reaccionar con uno de los enlaces disulfuro de otra molécula y así formar un dímero o trímero relativamente soluble, mismo que posteriormente mediante agregaciones formará partículas insolubles o gelificados.

Análisis de pH. El rango de pH que tuvieron los quesos fue de 3.8 a 4.6, en donde los valores más altos fueron aquellos elaborados con leche pasteurizada a mayor temperatura y los valores más bajos pertenecieron al queso elaborado con leche con una temperatura de pasteurización inferior (figura 4). La alta acidez que producen los gránulos de kéfir durante la fermentación de la leche se debe a la producción de ácido láctico que procede de la lactosa consumida por los microorganismos presentes, además se produce una leve fermentación alcohólica y formación de CO₂ (Arslan 2014).

Cuadro 8. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R^2 para la variable pH en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.

Factor	Coefficiente de regresión	Significancia
Intercepto	3.86E+00	0.000001*
X_1 : temperatura de pasteurización	1.36E-01	0.061607*
X_1^2 : temperatura de pasteurización	1.29E-01	0.084566*
X_2 : tiempo de incubación	-5.27E-03	0.925141
X_2^2 : tiempo de incubación	-3.11E-02	0.610825
X_1X_2 : interacción tiempo y temperatura	8.75E-02	0.305146
		$R^2=0.64$

* Factor significativo para una $P < 0.10$

La expresión matemática que representa el pH es un modelo cuadrático de segundo orden con productos cruzados que son expresados por los coeficientes que fueron significativos (Cuadro 8) según indica la ecuación:

$$\text{pH} = 3.856 + 0.1356 X_1 + 0.1289 X_1^2 \quad [7]$$

El R^2 encontrado fue de 0.64 para la variable pH, la prueba F con un nivel de significancia del 10% generó un valor F calculado de $6.02 > F$ tabular 2.92 (Anexo 3) y la falta de ajuste de 0.41 no fue significativa. Por lo descrito, esta variable presentó un comportamiento predictivo ya que cumplió con los tres parámetros.

El pH es un factor importante dado que afecta a la caseína por su punto isoeléctrico de 4.6, cuando este parámetro disminuye forma una textura quebradiza en el queso por la inestabilidad de las proteínas (Vargas y Villalta 2003). En la superficie de respuesta generada por el modelo se observó que a mayor temperatura de pasteurización el pH del queso aumentó (figura 4). Los valores obtenidos se asemejaron al estudio de Teixeira *et al.* (2011) donde describieron que después de 24 horas de fermentación el pH del kéfir fue de 4.42, al igual que los valores de pH inferiores coincidieron con Garrote *et al.* (2001) que concluyeron que el kéfir, obtenido de diferentes gránulos, alcanzó un pH entre 3.5 y 4.0 y con Luna que en 2015 describió que un pH de 3.8 fue hallado en las muestras con 5% de concentración de los gránulos de kéfir en leche pasteurizada de 85 a 90°C durante 30 minutos.

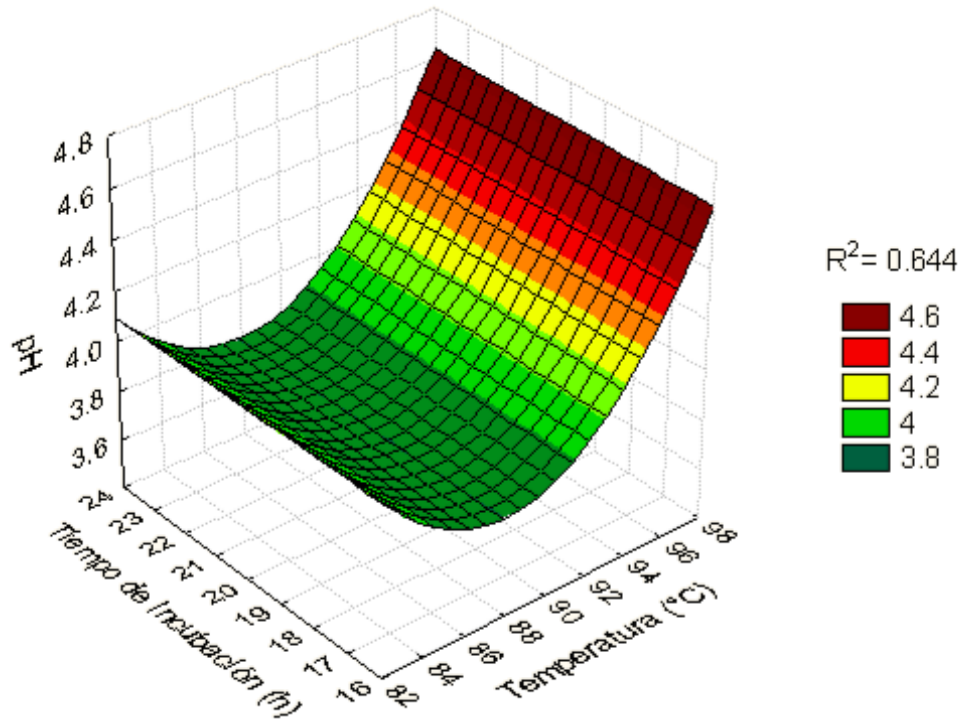


Figura 4. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en el pH del queso keferinado.

El tiempo de incubación de los gránulos de kéfir no tuvo una influencia en el cambio de pH (figura 4), estos resultados coincidieron en parte con Gutiérrez *et al.* (2003) que evaluaron el tiempo de incubación del inóculo a 24, 36 o 48 horas, resaltando que en las ocho primeras horas no hubo cambios significativos debido al prolongado periodo de latencia de las bacterias, sin embargo, al transcurrir el tiempo el pH fue descendiendo hasta llegar a 4.38, mismo que se mantuvo constante después de las 36 horas de incubación, esto debido a que la cantidad de lactosa disminuyó por lo cual la flora microbológica no pudo consumir más, manteniendo así estable el contenido de ácido láctico y evitando una disminución del pH.

Análisis de color a*. Este valor expresa la escala verde a rojo en un rango de (-60 a +60). El valor obtenido en el queso fluctuó desde -1.0 a 0.4 a medida que se incrementó la temperatura de pasteurización (figura 5) con lo cual las coloraciones (verde/roja) fueron prácticamente imperceptibles y muy cercanas al eje central. Estas leves tendencias en color pudieron deberse al crecimiento de los microorganismos del kéfir (color ligeramente rosado) y a las riboflavinas presentes en el suero del queso (color ligeramente verde) (Universidad de Zulia 2003). Pese a esto, el queso mantuvo su color blanquecino característico sin necesidad de añadir colorantes.

Cuadro 9. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R^2 para la variable color a^* en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.

Factor	Coefficiente de regresión	Significancia
Intercepto	-3.83E-01	0.018444*
X_1 : temperatura de pasteurización	3.86E-01	0.005934*
X_1^2 : temperatura de pasteurización	9.83E-02	0.385989
X_2 : tiempo de incubación	1.62E-01	0.145890
X_2^2 : tiempo de incubación	9.75E-03	0.929472
X_1X_2 : interacción tiempo y temperatura	-1.39E-01	0.355962
$R^2 = 0.74$		

* Factor significativo para una $P < 0.10$

La expresión matemática que representa el color a^* es un modelo lineal de segundo orden con productos cruzados que son expresados por los coeficientes que fueron significativos (Cuadro 9) según indica la ecuación:

$$\text{Color } a^* = -0.383 + 0.3860 X_1 \quad [8]$$

El R^2 encontrado para la variable color a^* fue de 0.74, la prueba F con un nivel de significancia del 10% generó un valor F calculado de 14.50 > F tabular 3.23 (Anexo 3) y la falta de ajuste de 0.36 no fue significativa. Por lo descrito, esta variable presentó un comportamiento predictivo ya que cumplió con los tres parámetros.

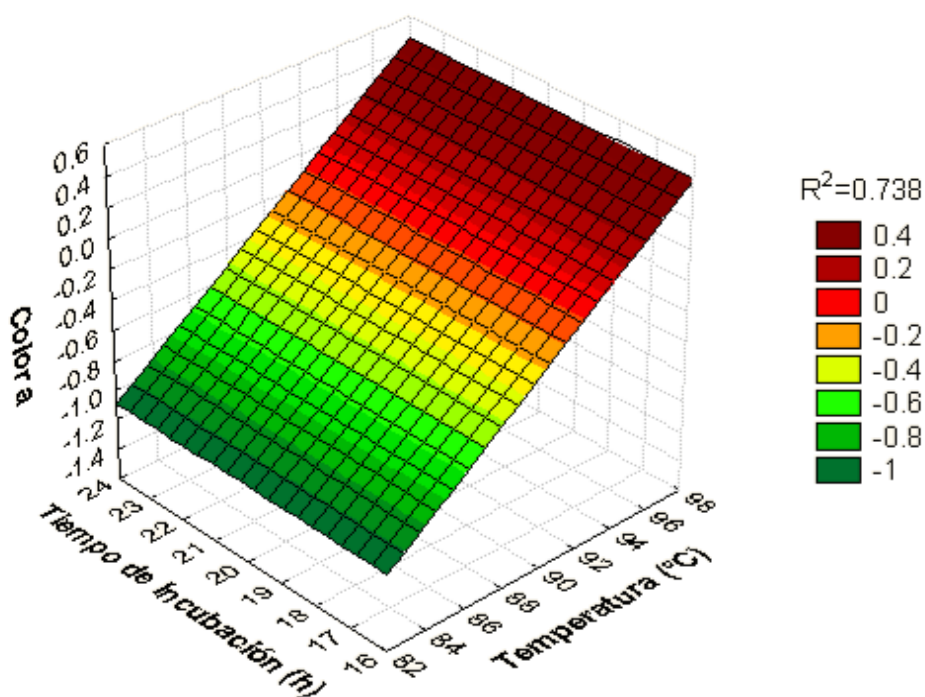


Figura 5. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización ($^{\circ}\text{C}$) en el color a^* del queso keferinado.

Análisis de viscosidad. La viscosidad promedio que presentaron los quesos en el día cero disminuyó de 1.41 a 1.10 (Pa.s) a medida que aumentó el gradiente de cizalla (figura 6). Este comportamiento permitió clasificar al queso keferinado como un fluido no newtoniano tipo pseudoplástico ya que conforme el gradiente de tensión cortante (100, 125, 150 rpm) aumentó, la viscosidad aparente del queso se redujo; impidiendo determinar una viscosidad constante. Este comportamiento coincidió con lo reportado por Antoniou *et al.* (s.f).

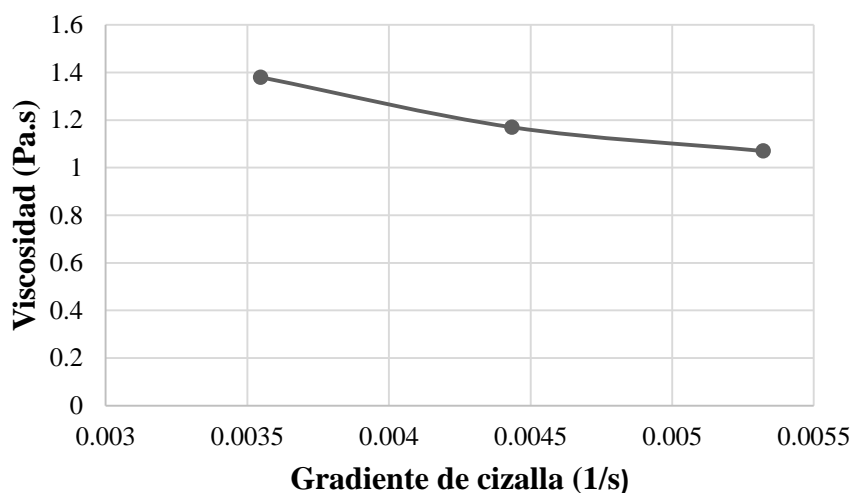


Figura 6. Reograma del queso keferinado.

La viscosidad es un parámetro dependiente de la cantidad de kefirán y proteína presente en el medio, por lo tanto a mayor velocidad de cizalla los arreglos y enlaces de proteínas se desenredaron con la ruptura de los enlaces de hidrógeno. La urea es un compuesto que tiene la capacidad de destruir los puentes de hidrógeno en las proteínas, por lo tanto Taxiathoula *et al.* (2011), observaron de una forma inmediata que al agregar urea a la leche keferinada ésta redujo notablemente su viscosidad. Esto también afectado por su bajo contenido de grasa que disminuye el gusto, el aroma y la viscosidad (Brito *et al.* 2006).

Cuadro 10. Análisis de varianza, coeficientes de regresión y R^2 para la variable viscosidad a en función de la temperatura de pasteurización y del tiempo de incubación en el queso keferinado.

Factor	Coefficiente de regresión	Significancia
Intercepto	1.20E+00	0.004095*
X_1 : temperatura de pasteurización	1.81E-01	0.321043
X_1^2 : temperatura de pasteurización	2.12E-02	0.907522
X_2 : tiempo de incubación	4.20E-01	0.058351*
X_2^2 : tiempo de incubación	3.30E-01	0.126612
X_1X_2 : interacción tiempo y temperatura	-1.93E-01	0.441771
		$R^2 = 0.57$

* Factor significativo para una $P < 0.10$

La expresión matemática que representa la viscosidad (Pa.s) es un modelo lineal de segundo orden con productos cruzados que son expresados por los coeficientes que fueron significativos (Cuadro 10) según indica la ecuación:

$$\text{Viscosidad (Pa.s)} = 1.1968 + 0.4204 X_2 \quad [9]$$

El R^2 encontrado la variable viscosidad fue de 0.57, la prueba F con un nivel de significancia del 10% generó un valor F calculado de 4.91 > F tabular 3.23 (Anexo 3) y la falta de ajuste de 0.27 no fue significativa. Por lo descrito, esta variable presentó un comportamiento tendencioso ya que cumplió con dos de los tres parámetros.

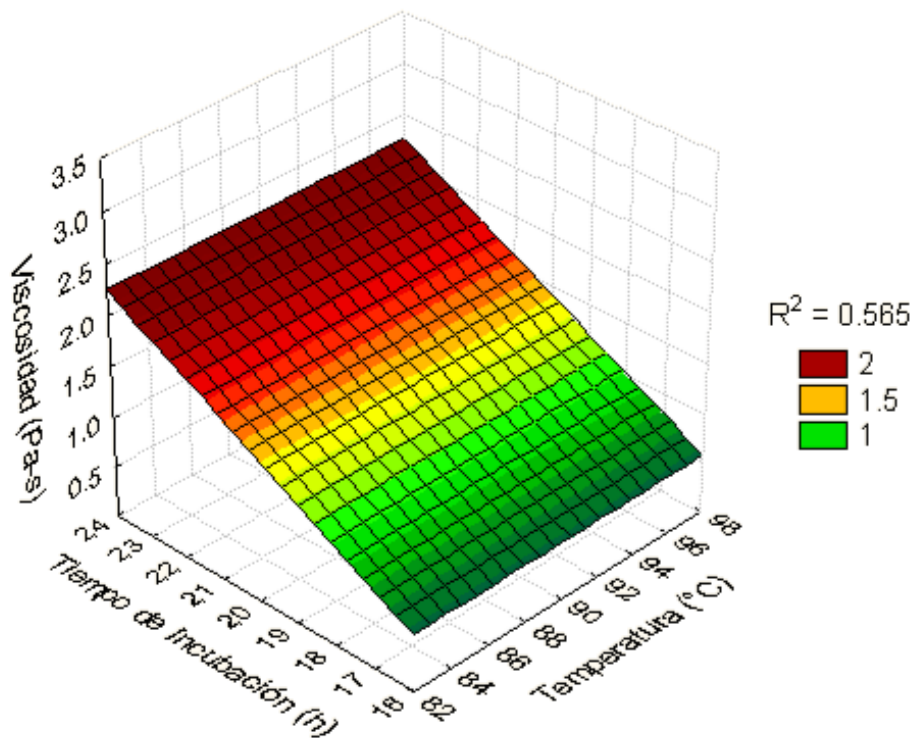


Figura 7. Superficie de respuesta del efecto del tiempo de incubación (h) y temperatura de pasteurización (°C) en la viscosidad a 100 rpm del queso keferinado.

El tiempo de incubación fue una variable significativa para la viscosidad, se observó que a medida que transcurrieron más horas de fermentación el producto presentó mayor viscosidad, fluctuando en un rango de 1 a 2 Pa.s (figura 7). Estos valores coincidieron con lo reportado por (Yoo *et al.* 2013) que obtuvieron una viscosidad de 1.2 a 1.8 Pa.s, sin embargo, éstos fueron analizados a 12 rpm.

La grasa y cantidad de kéfir son directamente proporcionales con la viscosidad obtenida, sin embargo, al haberse mantenido estos parámetros constantes para todos los tratamientos no fueron significativos en el análisis. A mayor tiempo de incubación se esperaba que exista mayor cantidad exopolisacáridos o kefirán, por lo tanto, el aumento de viscosidad obtenido

pudo atribuirse a la alta actividad de las bacterias *lactobacillus* (Taxiarhoula *et al.* 2011) presentes en el medio cuando no hubo un exceso de ácido láctico (Wildman 2007).

Los polisacáridos sintetizados durante la fermentación tienen la capacidad de incrementar la viscosidad de la fase del suero reteniendo el agua libre y por tanto, disminuyendo el flujo de agua; pese a esto, con el transcurso del tiempo se puede generar una glucohidrólisis que destruye los exopolisacáridos (EPS) debilitando esta matriz y disminuyendo la viscosidad (Bensmira *et al.* 2009). Estos resultados no se encontraron dado que el tiempo estudiado fue inferior, sin embargo, Pham *et al.* (2000), observaron una reducción en EPS después de 30 horas de incubación.

Función de utilidad. En la Metodología de Superficie de Respuesta esta función permite determinar la combinación idónea de las variables independientes para optimizar las variables dependientes y así lograr las características físicoquímicas y organolépticas deseadas en el producto final. Los valores óptimos de la temperatura de pasteurización de la leche y el tiempo de incubación de los gránulos de kéfir coincidieron con los puntos centrales propuestos en el modelo, es decir, éstos fueron 90 °C y 20 horas respectivamente (figura 8), lo cual permitió cumplir con la deseabilidad para las variables de purga (66.05%), rendimiento (26.73%), pH (3.86), color a* (-0.383) y viscosidad (1.20 Pa.s).

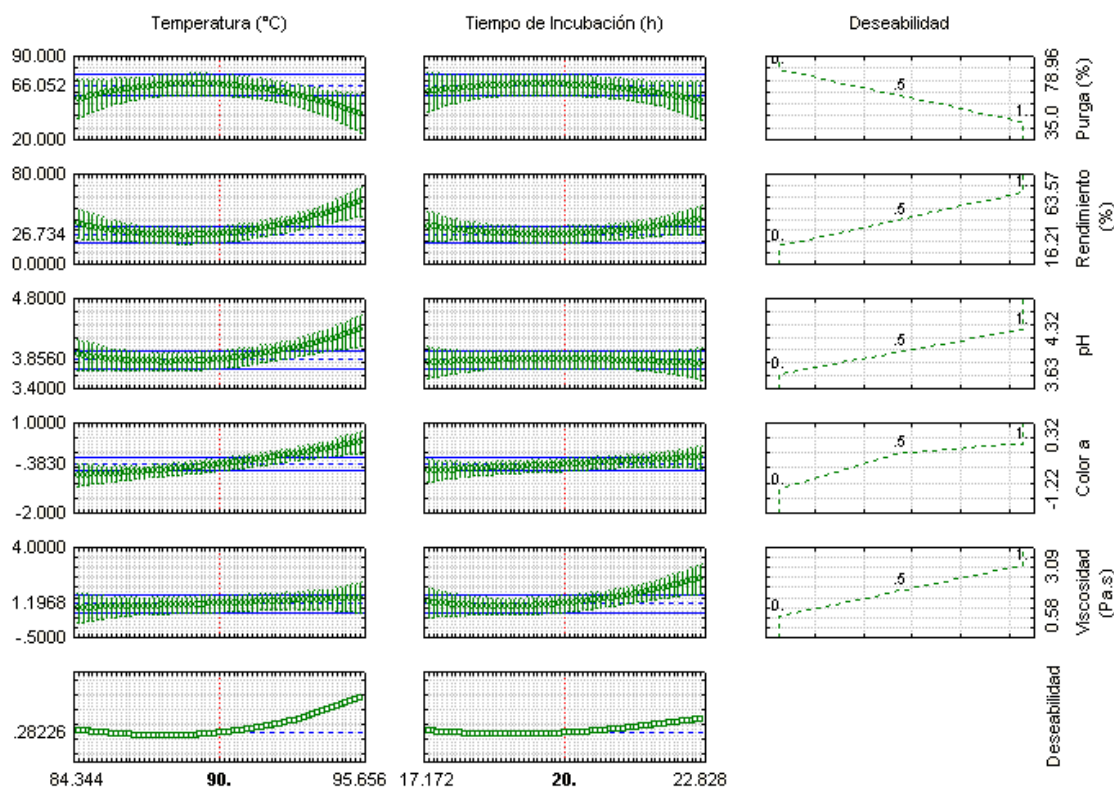


Figura 8. Función de utilidad para la optimización del queso kefirado.

Los Cuadros 11 y 12 muestran el promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables dependientes no significativas en la Metodología de Superficie de Respuesta.

Análisis de grasa. El queso keferinado califica como un queso descremado dado que su contenido de grasa fue menor al 10% o como una leche fermentada integral por tener su contenido de grasa en un rango de 3- 6% (Alimentos Argentinos s.f.). Se observó que todos los tratamientos con excepción del que se pasteurizó a 90 °C y tuvo 17.17 horas de incubación, experimentaron un incremento en su contenido de grasa luego de la fermentación, siendo el tratamiento de 86 °C por 22 horas el que tuvo mayor incremento. El aumento en contenido de grasa no presentó ninguna correlación con la temperatura de pasteurización o el tiempo de incubación, sin embargo, fue claro que durante la fermentación los quesos presentaron un ligero aumento en su contenido de grasa, esto puede atribuirse a que gran parte del contenido inicial del producto se perdió como suero (con bajo contenido en grasa) (UNAD s.f.), por lo cual la mayor parte de su materia grasa quedó concentrada en la matriz de caseínas que forman una red proteica.

En experimentos realizados con diferentes tipos de leche se observó que kéfir inoculado en leche vacuna tuvo 3.34% de grasa lo cual se asemejó a la mayoría de valores reportados en los tratamientos, sin embargo, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de grasa fue muy similar al experimento reportado con leche de búfala, que fue de 6.89% (Minamoga 2013).

El R^2 observado para esta variable fue de 0.95, por lo que se puede afirmar que los datos obtenidos se ajustaron en su mayoría al modelo lineal, además de que su coeficiente de variación fue de 7.43 lo que permitió inferir una baja variación experimental.

Análisis de ATECAL. El contenido de ácido láctico en el queso de kéfir para todos los tratamientos fue mayor a 1.03% lo cual indica que es un producto ácido, no se observaron diferencias significativas entre la mayoría de los tratamientos, pese a esto, el tratamiento que presentó mayor ATECAL fue el que tuvo mayor tiempo de incubación (90 °C por 22.83 horas). La producción de ácido láctico es dependiente de la temperatura de incubación, sin embargo, al haber mantenido constante esta temperatura, el incremento en el tiempo de incubación permitió obtener una acidez más elevada. Estos resultados concordaron con García *et al.* (2004) quienes evaluaron kéfir a 10 °C por 24, 48 y 56 horas obteniendo una acidez de 0.67, 0.78 y 1.0% respectivamente, sin embargo, mencionan que a mayores temperaturas la acidez aumenta disminuyendo el contenido de alcohol y CO₂.

Los valores estuvieron dentro del rango de las leches fermentadas, es decir, entre 0.9 a 1.2% (semFYC s.f.) lo cual produjo en los quesos un sabor ligeramente ácido, característico de este producto. El R^2 observado para esta variable fue de 0.92, por lo que se puede decir que el 92% de los datos se ajustaron al modelo lineal, además su coeficiente de variación fue de 2.41, es decir, el error y variabilidad durante el experimento fue reducido.

Análisis microbiológico. El conteo final de coliformes totales se asocia al manejo del queso durante el proceso de elaboración. Los resultados obtenidos para todos los tratamientos estuvieron dentro de los límites microbiológicos que establece la Secretaría de Agricultura

y Ganadería de Honduras (SAG 2001) y el Reglamento Técnico Centroamericano para los quesos frescos (RTCA 2008). En ningún tratamiento el conteo coliformes sobrepasó los 10 UFC/g lo que permitió confirmar que el tratamiento térmico fue efectivo, además que el control de la higiene fue constante durante todo el procesamiento.

Cuadro 11. Promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables grasa y ATECAL del queso keferinado.

Tratamiento		Grasa (%)	ATECAL (%)
Pasteurización (°C)	Tiempo de Incubación (h)		
86.00	18.00	3.98±0.33 c	1.05±0.04 cde
86.00	22.00	6.25±0.29 a	1.15±0.01 b
94.00	18.00	4.80±0.36 b	1.04±0.02 e
94.00	22.00	3.88±0.25 c	1.09±0.03 cd
84.34	20.00	3.63±0.25 cd	1.09±0.02 bc
95.66	20.00	3.00±0.00 e	1.08±0.00 cde
90.00	17.17	2.00±0.00 f	1.03±0.03 e
90.00	22.83	3.25±0.35 de	1.33±0.04 a
90.00	20.00	3.75±0.35 cd	1.06±0.03 cde
90.00	20.00	3.75±0.35 cd	1.07±0.04 cde
90.00	20.00	3.50±0.00 cde	1.06±0.00 cde
90.00	20.00	3.65±0.21 cd	1.06±0.03 de
90.00	20.00	3.50±0.14 cde	1.07±0.04 cde
% Coeficiente de variación		7.43	2.41
R²		0.95	0.92

a-f: diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P < 0.05)

Análisis de color. El color y el sabor son atributos variables que dependen de la composición química o del estado en el que se encuentra un determinado producto. Según Pinho *et al.* (2004) estos parámetros tienen una influencia inmediata en los criterios de decisión de compra de los consumidores, por lo cual es necesario cumplir con los estándares que regulan cada producto.

Color L*. Los valores de L* representan la luminosidad del producto y se expresan en una escala de 0 a 100; siendo 0 el valor más oscuro y 100 el más claro. Para esta variable se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos del punto central y los otros tratamientos que corresponden a los puntos axiales y factoriales (Cuadro 12). Todos los valores de L* fueron altos (entre 92 y 94) lo que significó un color muy cercano a blanco y con alta luminosidad. Brito *et al.* (2006), evaluaron queso Cabañas, producto muy parecido al queso keferinado, y encontraron que las muestras que tenían un color más blanco

presentaron mejor aceptación por lo cual el queso obtenido presentó características deseables, además de que por su alto contenido de humedad (aproximadamente un 85%) tuvo una textura suave y brillante (Álvarez *et al.* 2007).

Color a*. Los valores a* estuvieron muy cercanos al origen del plano, se observó una tendencia a cambio de color entre rojizo (valores positivos) y verdoso (valores negativos) de una forma imperceptible como se mencionó anteriormente. Los tratamientos presentaron diferencias significativas, observando una tendencia a obtener valores positivos en los quesos sometidos a mayores temperaturas de pasteurización (Cuadro 12).

Color b*. El rango del valor b* fluctuó de 9.98 a 13.61 dentro de la escala, es decir, los tratamientos presentaron colores ligeramente amarillentos, lo cual es deseable para este tipo de productos (Ertekin y Guzel-Seydim 2010). La coloración amarilla del queso pudo ser influenciada por el tipo de leche utilizada, el tiempo de maduración y principalmente por la cantidad de grasa que contuvo el producto final (Rudan *et al.* 1998). Estos valores fueron similares a los valores obtenidos por Guaraca (2008) para queso Zamodelfia a pesar que éste tiene un porcentaje de grasa muy superior al queso keferinado.

Índice de blancura. Los valores para este índice fluctuaron entre 83.98 y 87.65. El índice de blancura de todos los tratamientos analizados fue superior a 65, es decir, presentaron un color blanco intenso. Esto sucedió porque la agregación de caseínas durante la fermentación mejoró la capacidad de reflejar el color blanco (Johnson 1999).

Cuadro 12. Promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables de color del queso keferinado.

Tratamiento		Color			Índice de Blancura
Pasteurización (°C)	Tiempo Incubación (h)	L*	a*	b*	
86.00	18.00	93.50±0.10 a	-1.22±0.25 e	11.01±0.88 e	87.15±0.79 ab
86.00	22.00	92.77±0.69 def	-0.58±0.17 d	9.98±0.32 f	87.65±0.44 a
94.00	18.00	92.32±0.31 fg	0.24±0.28 ab	11.12±0.50 e	86.47±0.40 c
94.00	22.00	91.94±0.27 g	0.32±0.12 a	12.73±0.49 bc	84.93±0.41 e
84.34	20.00	92.79±0.17 cde	-0.41±0.24 d	12.27±0.59 cd	85.76±0.44 d
95.66	20.00	92.39±0.48 efg	0.11±0.21 abc	12.97±0.85 abc	84.95±0.79 e
90.00	17.17	93.06±0.50 abcd	-0.54±0.13 d	11.47±0.90 de	86.56±0.55 bc
90.00	22.83	92.94±0.34 bcd	-0.12±0.22 c	13.22±0.62 ab	85.01±0.50 e
90.00	20.00	92.98±0.47 bcd	-0.47±0.30 d	10.95±0.70 e	86.97±0.37 bc
90.00	20.00	93.07±0.44 abcd	-0.46±0.53 d	13.61±0.82 a	84.70±0.54 e
90.00	20.00	93.30±0.21 ab	-0.55±0.15 d	11.10±0.25 e	87.02±0.14 bc
90.00	20.00	91.32±0.47 h	-0.46±0.47 d	13.44±0.45 ab	83.98±0.15 f
90.00	20.00	93.23±0.21 abc	0.02±0.24 bc	11.50±0.48 e	86.65±0.42 bc
% Coeficiente de variación		0.43	0.21	5.17	0.57
R²		0.75	0.79	0.82	0.88

a-h: diferente letras en la misma columna indican diferencias significativas (P< 0.05)

Segunda Fase.

Análisis de color. Los resultados para los análisis de color en el queso con y sin fitosterol no presentaron diferencias significativas para los valores de L* y a*, sin embargo, para b* estos fueron estadísticamente diferentes, en donde el queso con fitosterol presentó valores inferiores atribuido principalmente a la adición de aceite de oliva y fitosterol, lo cual al incorporarlo al queso redujo relativamente su croma acercándolo al eje central (Cuadro 13).

Análisis de viscosidad. Las viscosidades del queso con y sin fitosterol fueron estadísticamente iguales, además mantuvieron su comportamiento de fluido no newtoniano tipo pseudoplástico (figura 9).

Análisis microbiológico. El conteo de coliformes totales fue de 0 UFC/g de queso para ambos tratamientos, es decir, éstos cumplieron con los parámetros aceptados para este tipo de productos.

Cuadro 13. Promedio, desviación estándar y separación de medias para las variables de color y viscosidad del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol.

Queso	Color			Viscosidad (Pa.s)
	L*	a*	b*	
Con fitosterol	93.41±0.15 a	-1.14±0.17 a	12.67±0.26 b	1.21±0.19 a
Sin fitosterol	93.57±0.25 a	-1.27±0.24 a	12.93±0.37 a	1.35±0.37 a
% CV	0.19	0.13	1.75	9.29
R ²	0.68	0.76	0.79	0.91

a-b: diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P< 0.05)

CV: coeficiente de variación

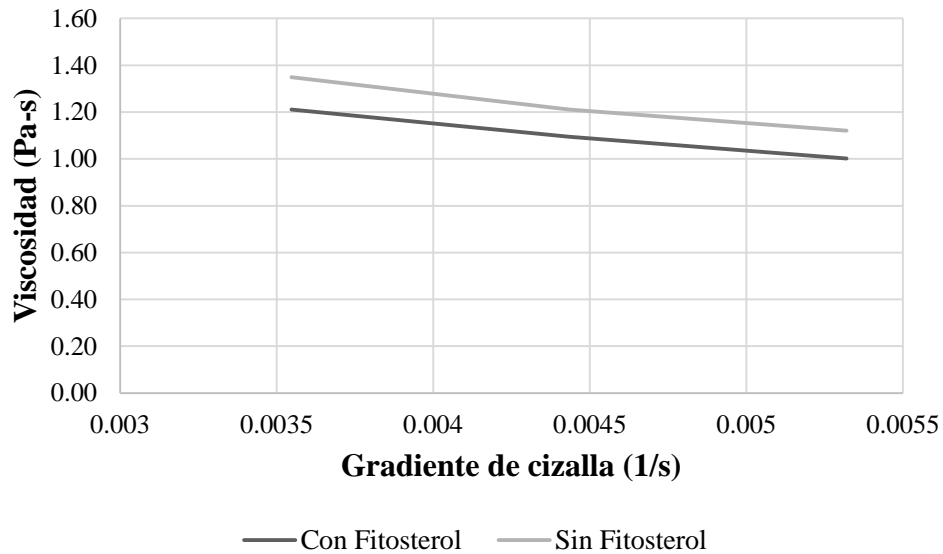


Figura 9. Reograma del queso keferinado óptimo al día cero con y sin fitosterol.

Análisis proximal. No existieron diferencias significativas entre los análisis proximales del queso con y sin fitosterol para las variables de humedad, proteína, carbohidratos, cenizas y fibra cruda (Cuadro 14). Sin embargo, el contenido de grasa si fue estadísticamente diferente, en donde el queso con fitosterol aumentó aproximadamente un 3% de grasa con respecto al queso sin fitosterol, esto debido a la adición de aceite de oliva para la esterificación del fitosterol. Los valores obtenidos fueron cercanos a los reportados por Minamoga (2013) para leche keferinada y Pacheco (2004) para queso Cabañas. La actividad de agua en ambos quesos fue estadísticamente igual y elevada, esto se debió principalmente a que el contenido de humedad presente en ambos quesos fue alta lo cual los hace susceptibles a crecimiento de mohos, sin embargo, el pH bajo es una barrera en el producto.

Cuadro 14. Análisis proximal del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol al día cero.

Queso	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína cruda (%)	Grasa Cruda (%)	Fibra Cruda (%)	Carbohidratos (%)	Actividad de Agua
Con fitosterol	82.72±0.57 a	0.81±0.02 a	6.31±0.62 a	6.45±0.69 a	0.99±0.42 a	3.36±1.65 a	0.88±0.01 a
Sin fitosterol	85.17±0.06 a	0.79±0.09 a	6.65±0.24 a	3.71±1.14 b	0.15±0.01 a	3.02±0.06 a	0.89±0.01 a
% CV	0.43	9.63	4.12	9.25	50.66	35.23	0.45
R²	0.98	0.31	0.87	0.97	0.91	0.55	0.81

a-b: diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas (P< 0.05)

CV: coeficiente de variación

Determinación de esteroides vegetales. Debido a la ausencia de los estándares para fitosteroides en el Laboratorio de Análisis de Alimentos no se pudo determinar el perfil de los mismos ni la cantidad presente. Sin embargo, a manera de comparación se presentan los tiempos de elución y sus respectivas áreas para las muestras con y sin fitosterol (Cuadro 15) a partir de los cromatogramas obtenidos (Anexos 9 y 10). Se observó que el tiempo de elución fue inferior a los 15 minutos para ambos quesos a pesar que el análisis total duró aproximadamente 42 minutos, además se notó que algunos tiempos coincidieron.

Cuadro 15. Tiempos de elusión y áreas de pico en la cromatografía de esteroides vegetales para queso kefirizado óptimo con y sin fitosterol.

Número de pico	Con fitosterol				Sin fitosterol			
	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 1		Muestra 2	
	TE (min)	AP (pA × s)	TE (min)	AP (pA × s)	TE (min)	AP (pA × s)	TE (min)	AP (pA × s)
1	0.862	13522.000	0.861	10329.800	0.905	55125.000	0.862	13463.000
2	0.905	35078.100	0.904	41019.500	1.060	5.673	0.905	38947.300
3	1.246	90.456	1.239	3.057	1.912	1.250	1.060	26.542
4	4.945	83.853	4.927	5.837	4.982	8.304	1.929	170.964
5	5.550	77.483	4.996	68.080	5.871	1.558	4.934	62.334
6	6.099	3738.263	5.537	5.359	6.744	13.842	5.850	13.683
7	6.452	37.112	6.442	3.625	6.824	5.775	6.778	1487.131
8	11.847	27.419	11.498	2.648	7.335	1.063	6.852	519.382
9	13.632	375.234	13.606	47.873	10.576	3.387	7.446	13.037
10	14.075	380.270	14.047	44.414			10.573	2.793
11	14.971	636.495	14.928	75.875				

TE: tiempo de elusión

AP: área de pico

Los esteroides vegetales añadidos al producto fueron extraídos de soya (*Glycine max*), según la información proveída por la etiqueta del fitosterol mostró que cada gramo de esteroide vegetal aporta 400 mg de beta-sitosterol, 270 mg de campesterol, 100 mg de estigmasterol y 100 mg de brasicasterol. Este tipo de esteroides vegetales son los más abundantes en plantas, aunque no se encuentran distribuidos homogéneamente en éstas (Ostlund 2002). Prácticamente todos tienen estructura similar, cumplen las mismas funciones y actúan de la misma manera en el cuerpo cuando son ingeridos, disminuyendo la absorción del colesterol a nivel intestinal.

Con una ingesta habitual de consumo (dos a tres porciones) de queso fortificado con 0.75 g de fitosterol al día se podría reducir el colesterol LDL, esto es confirmado por la curva de dosis-respuesta obtenida en el meta-análisis de Plaza (2001) concluyó que una dosis de dos gramos de esteroides vegetales totales (provenientes de vegetales consumidos y de alimentos fortificados) mostró una disminución máxima de 10 % en el colesterol total, sumando a esto el mínimo aporte de fitosteroides provenientes del aceite de oliva añadido que fue de 0.002 g por porción (Breuleux 2009).

Análisis sensorial. Se evaluaron dos muestras de queso keferinado, con fitosterol y sin fitosterol, a través de una prueba discriminativa y una prueba afectiva de preferencia. Con ($P < 0.05$) ninguno de estos análisis presentó diferencias estadísticas. Estos resultados fueron congruentes y favorables para el estudio ya que los panelistas no entrenados al no detectar diferencias entre los atributos de las muestras presentadas tampoco iban a tener preferencia por alguna de ellas. Basado en esto se puede afirmar que la adición de fitosterol al queso no tuvo repercusiones en sus atributos sensoriales, por lo cual podría ser fácilmente integrado a este producto.

Análisis sensorial de discriminación. Los panelistas no pudieron diferenciar entre la muestra con fitosterol y la muestra control sin fitosterol. Con un grado de libertad ($n-1$) de 1, siendo n el número de muestras de queso y con una probabilidad del 5% se obtuvo un Chi calculado de 0.08 que al compararlo con el Chi tabular de 3.84 (Anexo 8) no fue estadísticamente significativo.

Análisis sensorial afectivo. Los panelistas no tuvieron preferencia entre las dos muestras analizadas. Con un grado de libertad ($n-1$) de 1, siendo n el número de muestras de queso y con una probabilidad del 5% se obtuvo un Chi calculado de 3.24 que al compararlo con el Chi tabular de 3.84 (Anexo 8) no fue estadísticamente significativo.

Evaluación de ATECAL y purga en el tiempo. La vida útil de un alimento comprende el tiempo transcurrido entre la fabricación y el momento en que se presentan cambios significativos que pueden generar rechazo del consumidor final (Valencia *et al.* 2008). El kéfir tiene un periodo de vida útil que va de 10-14 días a una temperatura de almacenamiento de 4 °C (CDC 2011), limitado principalmente por una post-acidificación en almacenamiento (Rajapaksha *et al.* 2013).

Para este análisis en el tiempo se consideró la acidez porque es un factor influyente en la preservación de alimentos, composición de las proteínas y los productos finales del metabolismo, además, interviene en el crecimiento y la supervivencia de los

microorganismos. Así mismo, la sinéresis fue considerada ya que sirve como indicativo de la estabilidad del producto cuando manifiesta la separación de fases en la mezcla formada (Randazzo *et al.* 2012).

En el queso de kéfir la cantidad de ácido láctico aumentó de 1.24% hasta 1.48 y 1.52% en el queso con y sin fitosterol, respectivamente, al transcurrir los 15 días de almacenamiento. Se observó en ambos quesos un mayor incremento de ATECAL del día seis al día nueve lo cual podría atribuirse a que en la primera fase de almacenamiento continuó la alta actividad metabólica de las bacterias ácido lácticas (Kang *et al.* 2013).

El queso con fitosterol mostró una ligera reducción de la acidez a partir del día seis lo cual podría estar asociado a reacciones de lipólisis, en donde se liberan ácidos grasos libres que provocan que ésta no siga aumentando (Randazzo *et al.* 2012) o a que las levaduras presentes pudieron haber consumido el ácido láctico y ácido acético presente (Taxiarhoula *et al.* 2011), sin embargo, en el queso sin fitosterol el aumento de ácido láctico fue paulatino. La mayor pérdida de suero se produjo en los días seis y nueve para ambos tratamientos, después esta pérdida cesó (Cuadro 16).

Cuadro 16. Evaluación de ATECAL y purga del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol en el tiempo.

Día	Purga (%)		ATECAL (%)	
	Con fitosterol	Sin fitosterol	Con fitosterol	Sin fitosterol
0	0.00	0.00	1.24	1.24
3	0.00	0.00	1.30	1.24
6	0.57	0.73	1.46	1.44
9	1.14	1.47	1.40	1.46
12	0.00	0.00	1.40	1.46
15	0.00	0.00	1.48	1.52

Determinación de costos variables. Con fines comparativos se calcularon los costos del queso keferinado en base a las presentaciones actuales de 230 y 450 g para el queso Cabañas de la Planta de Procesamiento de Lácteos de Zamorano.

En el análisis de costos variables no se incluyó al kéfir por ser un costo de inversión (se reutiliza), sin embargo, el costo de 50 g de gránulos de kéfir fue de L.385. El costo obtenido para el queso keferinado sin fitosterol en ambas presentaciones es menor en comparación al costo de producción del queso Cabañas para la presentación de 230 g que es de L.15.25 y para la de 450 g que es de L.26.6 (Cuadro 17), mientras que el queso keferinado con fitosterol fue mayor para ambas presentaciones. Sin embargo, el ahorro en costos por usar gránulos de kéfir podría ser recompensado en los costos de mano de obra para su elaboración.

Cuadro 17. Costos variables del queso keferinado óptimo con y sin fitosterol en presentaciones de 230 y 450 gramos.

Ingrediente	Cantidad	Presentación 230 g		Cantidad	Presentación 450 g	
		Fitosterol			Fitosterol	
		Con	Sin		Con	Sin
Leche	880.00 mL	8.40	8.40	1720.00 mL	16.43	16.43
Cuajo	0.08 mL	0.05	0.05	0.17 mL	0.11	0.11
Sal	2.30 g	1.73	1.73	4.50 g	3.38	3.38
Sorbato de potasio	0.02 g	0.03	0.03	0.05 g	0.07	0.07
Fitosterol	5.75 g	6.57	0.00	11.25 g	12.86	0.00
Aceite de oliva	5.75 g	3.67	0.00	11.25 g	7.18	0.00
	L.	20.45	10.21		40.01	19.97
Total	USD.	0.93	0.46		1.82	0.91

4. CONCLUSIONES

- La temperatura de pasteurización de 90 °C y el tiempo de incubación de 20 horas fue la combinación óptima para obtener un queso con mayor viscosidad, rendimiento y pH.
- La temperatura de pasteurización fue la variable que tuvo mayor influencia en la fermentación del queso.
- Los quesos con y sin fitosterol no presentaron diferencias sensoriales significativas.
- El aceite de oliva y el fitosterol incrementaron el costo del queso en un 100% en comparación con el queso que no tuvo adición de esteroides vegetales.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de la temperatura de incubación y la cantidad de inóculo en las propiedades de un queso elaborado con leche keferinada.
- Evaluar el efecto sobre las propiedades reológicas del kéfir al aplicar doble tratamiento térmico a la leche.
- Realizar un método estándar para la determinación de esteroides vegetales y adquirir estándares para poder compararlos.
- Usar otro tipo de alimentos que sirvan como medio de esterificación para los fitosteroides.
- Dar seguimiento al estudio evaluando el efecto en la reducción de colesterol sanguíneo en un segmento delimitado de personas con hipercolesterolemia.

6. LITERATURA CITADA

Alimentos Argentinos. s.f. Código Alimentario Argentino. Capítulo VIII: Alimentos lácteos (en línea). Consultado 29 de septiembre de 2015. Disponible en http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/marco/CAA/Capitulo_08.htm.

Álvarez, S., Rodríguez, M., Ruiz, M., Fresno, M. 2007. Correlación de textura y color instrumental con la composición química de quesos de cabra canarios. Instituto canario de investigación agraria. Santa Cruz de Tenerife, España. Archivos de Zootecnia 56(1):663-666.

Antoniou, K., Topalidou, S., Tsavalía, G., Dimitreli, G. s.f. Effect of Starter Culture, Milk Fat and Storage Time on the Rheological Behaviour of Kefir. Department of Food Technology, ATEI of Thessaloniki, Greece.

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. International Home page (en línea). Consultado 01 de octubre de 2015. Disponible en <http://www.eoma.aoac.org/>

Arslan, S. 2014. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. Journal of Food 13(3):340-345.

Bañuls, C. 2012. Esteroles vegetales en bebidas lácteas: efecto sobre el perfil lipídico y estimación de su biodisponibilidad. Tesis Doctorado. Valencia, España, Universidad de Valencia. 219 p.

Base SAS® TS1M2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Bensmira, M., Nsabimana, C., Jiang, B. 2009. Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. ELSEVIER. 5p.

Breuleux, N. 2009. Regula tu colesterol. Salud y Vitalidad, Barcelona, España. . Editorial Hispano Europea S.A. p 34-38.

Brito, C., Pino, M., Molina, L., Molina, I., Horzella, M., Schöbitz, R. 2006. Queso Cottage elaborado con cultivo láctico Redi-Set y DVS, usando crema láctea homogenizada y sin homogenizar. Revista chilena de nutrición 33(1).

Calvente, J. 2009. Gastronomía. Apoloybaco (en línea). Consultado 30 de agosto de 2015. Disponible en <http://www.apoloybaco.com/comensalconocias0109.htm>.

Canadian Dairy Commission (CDC). 2011. Fermented Milk Products (en línea). Consultado 20 de septiembre de 2015. Disponible en <http://www.milkingredients.ca/index-eng.php?id=180>.

Conchillo, A., Valencia, I., Puente, A., Ansorena, D., Astiasarán, I. 2005. Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. España. *Nutrición Hospitalaria* 21(3):369-373.

Conis, E. 2008. Kefir's good but may not merit a halo. Los Ángeles, Estados Unidos (en línea). Consultado 30 de agosto de 2015. Disponible en <http://articles.latimes.com/2008/sep/15/health/he-nutrition15>.

Ertekin, B., Guzel-Seydim, Z. 2010. Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the science of food and agriculture*. PubMed.

Frau, F., Font, G., Pece, N. 2014. Effect of Pasteurization Temperature, Starter culture, and Incubation Temperature on the Physicochemical Properties, Yield, Rheology, and Sensory Characteristics of Spreadable Goat Cheese. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. 9 p.

Gálvez, M. 2012. Estudio experimental sobre la obtención de kéfir (leche kefirada) en nuestro medio, partiendo de la reproducción y mantención de los nódulos de kéfir. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador. 128 p.

García, G., Quintero R., López. M. 2004. *Biotecnología Alimentaria*. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México. p. 337-338.

Garrote, G., Abraham, A., Antonini, I. 2001. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *Journal of Dairy Research* 68(4):639-652.

Gómez, D. y Bedoya, O. 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Colombia. *Revista Lasallista de Investigación* 2(1) p. 38-42.

Guaraca, A. 2008. Efecto del porcentaje de grasa y el tiempo de maduración en las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del queso Zamodelfia. Tesis Ingeniería Agroindustria Alimentaria. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 41 p.

Gutiérrez, H. y De la Vara, R. 2008. *Análisis y diseños de experimentos*. Segunda Edición. México, Editorial McGraw-Hill Interamericana. 564 p.

Gutiérrez, N., Pérez, Q., Caro, I., Mateo, J., Nevarez, V. 2003. Efecto del porcentaje de inóculo y del tiempo de incubación sobre las características físico-químicas del kéfir. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencia Químicas.

Hidalgo, J. 2004. Alimentos con fitosteroles. *Consumer.es* (en línea). Consultado 06 de Junio de 2014. Disponible en <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/normativa-legal/2004/04/12/11768.php/>

- Johnson, M. 1999. Casein-how it color cheese. Dairy Pipeline 11(2):2-5.
- Jones, P., MacDougall, D., Ntanios, F., Vanstone, C. 1997. Dietary phytosterols as cholesterol-lowering agents in humans. *Can J Physiology and Pharmacology* 75: 217-227.
- Kang, K., Park, C., Lee, S. 2013. Effects of D-tagatose on the growth of intestinal microflora and the fermentation of yogurt. *J. Korean Soc. Food Science Nutrition*. p 348-354.
- Kutney, J., Ding, Y., Chen, H., Hou, D., Milanova, R. 2005. Conjugados de fitosterol o fitostanol con ácido ascórbico y su utilización en el tratamiento y en la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Oficina Española de Patentes y Marcas (en línea). Consultado 13 de septiembre de 2015. Disponible en http://www.espatentes.com/pdf/2226856_t3.pdf.
- Minamoga, C. 2013. Composición nutricional y química del kéfir de leche. Edellwais (en línea). Consultado 26 de septiembre de 2015. Disponible en <http://www.mi-tema-el-kefir-por-edellwa.es/products/composicion-nutricional-y-quimica-del-kefir-de-leche/>
- Luna, M. 2015. Análisis físico-químico y reológico para la producción de leches ácidas a base de nódulos de kefir. Tesis Experiencia Recepcional. Veracruz, México. Universidad Veracruzana 89 p.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2015. Nutrición (en línea). Consultado 30 de agosto de 2015. Disponible en <http://www.who.int/topics/nutrition/es/>
- Ostlund, R. Jr. 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 22. p. 533-549.
- Pacheco, L. 2004. Efecto de la concentración de cultivo láctico y la acidez de corte en el tiempo de incubación y las características físicas y sensoriales del queso Cabaña. Tesis Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 64 p.
- Pham, P., Dupont, I, Roy, G., Lapointe, G., Cerning, J. 2000. Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied Environmental Microbiology*.
- Pinho, O., Mendes, E., Alves, M., Ferreira, I. 2004. Chemical, physical and sensorial characteristics of “Terrincho” ewe cheese: Changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science* 87(2). p. 249-257.
- Plat, J., Kerckhoffs, D., Mensink, R. 2000. Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Current Opinion Lipidol* 11:571-576.
- Plaza, I. 2001. Los fitosteroles, el colesterol y la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Unidad de Cardiología Preventiva y Rehabilitación. Hospital La Paz. Madrid. p 210-218.

Rajapaksha, D., Kodithuwakku, K., Silva, K., Rupasinghe, R. 2013. Evaluation of Potassium sorbate and E-polylysine for their inhibitory activity on post-acidification of set yoghurt under cold storage for 20 days. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume 3. 7 p.

Randazzo, G., Rinaldoni, A., Campderrós, M. 2012. Desarrollo de quesos untables enriquecidos con proteínas de soja. *Tecnología Láctea Latinoamericana* 74:46-51.

Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA). 2008. Alimentos. Criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos. RTCA 67.04.50:08 (en línea). Consultado 13 de octubre de 2015. Disponible en http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/cri74_t.pdf.

Romero, R. y Mestres, J. 2004. Productos lácteos. *Tecnología*. Volumen 161. Capítulo 1. Catalunya.

Rosado, P. y Rosado, J. 2013. UF1179: Tratamientos previos de la leche. INAE0209. 1ª Edición. IC Editorial, Antequera, Málaga.

Rudan, M., Barbano, M., Guo, P., Kindstedt. 1998. Effect of the modification of fat particle size by homogenization on composition, proteolysis, functionality, and appearance of reduced fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 81:2065–2076.

Sanclemente, T., Marques, I., Fajó, M., Puzo, J. 2012. Beneficios dietéticos asociados a la ingesta habitual de dosis moderadas de fitosteroles presentes de forma natural en los alimentos. *Revista clínica en Investigación y Arteriosclerosis* 24(1).

Secretaría de Agricultura y Ganadería. 2001. La Gaceta. Diario Oficial de la República de Honduras. Acuerdo No. 656-01 (en línea). Consultado 25 de septiembre del 2015. Disponible en <http://www.senasa-sag.gob.hn/wp-content/uploads/2014/08/Reglamento-para-la-Inspeccion-y-Certificacion-Sanitaria-de-la-Leche-y-los-Productos-Lacteos.pdf>.

semFYC. s.f. Queso, yogur y otras leches fermentadas. Monografía científica (en línea). Consultado 28 de septiembre de 2015. Disponible en http://www.lacteosinsustituibles.es/p/archivos/pdf/monografia_queso_yogur_otraslechesfermentadas.pdf.

Taxiarhoula, I., Klio D., Evdioxios, I. 2011. Effect of milk fat, kefir grain inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristics of kefir. *A.T.E.J. of Thessaloniki, Grecia*. 10 p.

Teixeira, K., de Melo, G., Campos, C., Dragone, G., Freitas, R. 2011. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42(2).

Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). s.f. Suero lácteo. Definición y componentes del suero (en línea). Consultado 26 de septiembre de 2015. Disponible en http://datateca.unad.edu.co/contenidos/211613/Modulo_zip/leccin_35_suero_lcteo.html.

Universidad de Zulia (LUZ). 2003. Introducción al control de calidad de la leche cruda. Facultad de Ciencias Veterinarias, Departamento de Producción e Industria Animal. Maracaibo, Venezuela. 24 p.

U.S. Department of Agriculture (USDA). 2015. National Nutrient Database for Standard Reference Release 27 (en línea). Consultado 20 de septiembre de 2015. Disponible en <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/72>.

Valencia, F., Milán, L., Garcés, Y. 2008. Revista Lasallista de Investigación. 5(1):28-23.
Vargas, R. y Villalta, H. 2003. Estudio de Factibilidad del Queso Procesado Untable. Tesis Ingeniería Agroindustria Alimentaria e Ingeniería Agronegocios. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 86 p.

Walstra, P., Wouters, J., Geurts, T. 2006. Dairy Science and Technology. Segunda edición. CRC Press. Taylor Francis Group. Estados Unidos. p 231-233.

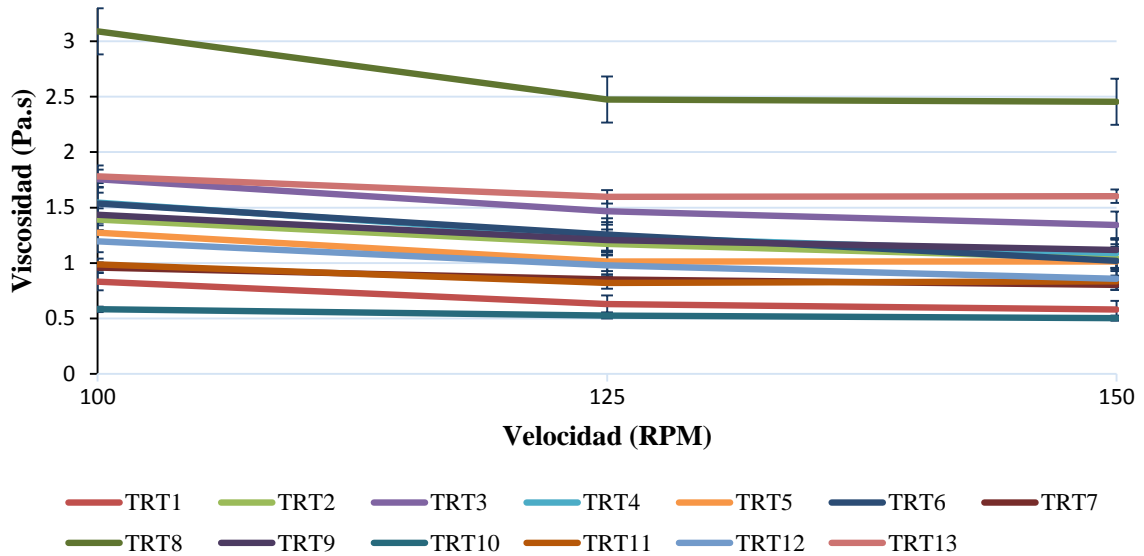
Wildman, R.E. 2007. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Segunda edición. Estados Unidos. CRC Press. p 354-365.

Yoo, S., Seong, K., Yoon, S. 2013. Physicochemical Properties of kefir Manufactured by a Two-Step Fermentation. Biological Science and Technology, Yonsei University. Korea. 8 p.

Zimmermann, K. y Ruiz, H. 2010. Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla, México.

7. ANEXOS

Anexo 1. Viscosidad de queso keferinado al día cero para todos los tratamientos. Temperatura promedio: 23-24 °C.



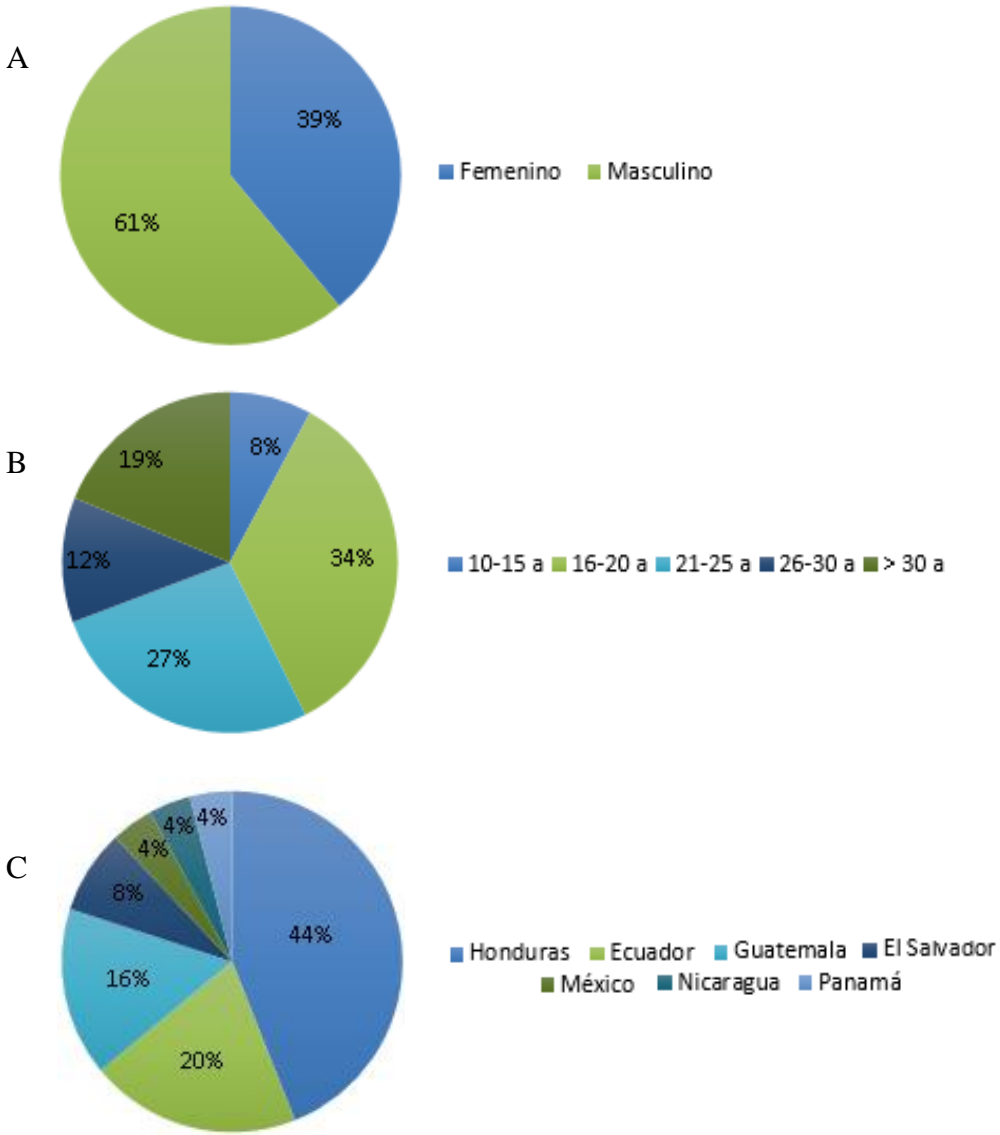
Anexo 2. Valores F calculado P= 0.10 para las variables purga, rendimiento, pH, color a* y viscosidad.

Variable Dependiente	Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GL	Media de Cuadrados	F calculado	F tabular
Purga	Regresión	562.3520	1	562.3520	7.30	3.23
	Residuos	847.1110	11	77.010		
Rendimiento	Regresión	1023.6912	2	511.846	7.57	2.92
	Residuos	676.5568	10	67.656		
pH	Regresión	0.2627	2	0.1313	6.02	2.92
	Residuos	0.2182	10	0.0218		
Color a*	Regresión	1.1922	1	1.1922	14.50	3.23
	Residuos	0.9042	11	0.0822		
Viscosidad	Regresión	1.4138	1	1.4138	4.91	3.23
	Residuos	3.1667	11	0.288		

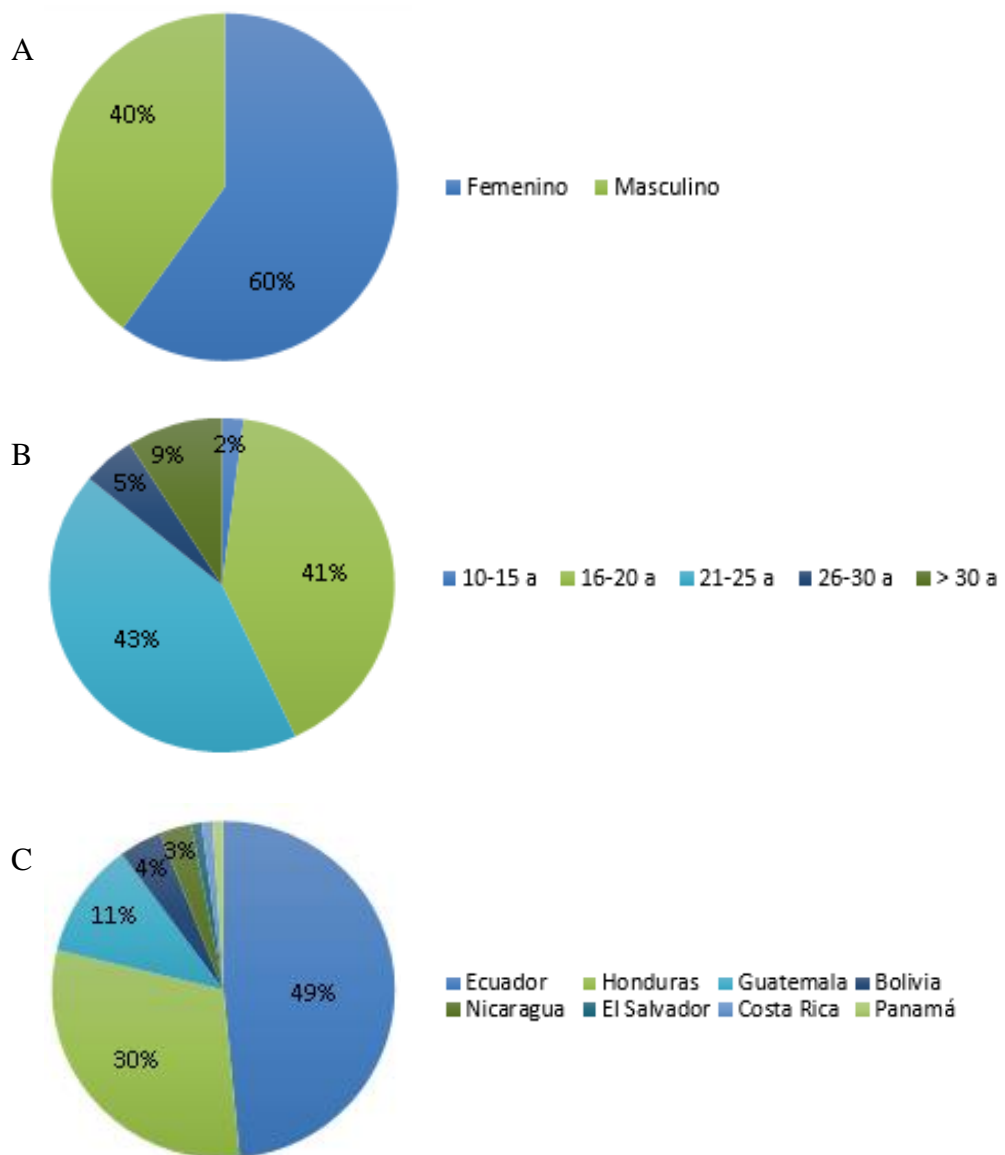
Anexo 3. Tabla de puntos de porcentaje de la distribución F (P= 0.10).

v2 \ v1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	39,86	49,50	53,59	55,83	57,24	58,20	58,91	59,44	59,86	60,19	60,71	61,22	61,74	62,00	62,26	62,53	62,79	63,06	63,33
2	8,53	9,00	9,16	9,24	9,29	9,33	9,35	9,37	9,38	9,39	9,41	9,24	9,44	9,45	9,46	9,47	9,47	9,48	9,49
3	5,54	5,46	5,39	5,34	5,31	5,28	5,27	5,25	5,24	5,23	5,22	5,20	5,18	5,18	5,17	5,16	5,15	5,14	5,13
4	4,54	4,32	4,19	4,11	4,05	4,01	3,98	3,95	3,94	3,92	3,90	3,87	3,84	3,83	3,82	3,80	3,79	3,78	3,76
5	4,06	3,78	3,62	3,52	3,45	3,40	3,37	3,34	3,32	3,30	3,27	3,24	3,21	3,19	3,17	3,16	3,14	3,12	3,10
6	3,78	3,46	3,29	3,18	3,11	3,05	3,01	2,98	2,96	2,94	2,90	2,87	2,84	2,82	2,80	2,78	2,76	2,74	2,72
7	3,59	3,26	3,07	2,96	2,88	2,83	2,78	2,75	2,72	2,70	2,67	2,63	2,59	2,58	2,56	2,54	2,51	2,49	2,47
8	3,46	3,11	2,92	2,81	2,73	2,67	2,62	2,59	2,56	2,54	2,50	2,46	2,42	2,40	2,38	2,36	2,34	2,32	2,29
9	3,36	3,01	2,81	2,69	2,61	2,55	2,51	2,47	2,44	2,42	2,38	2,34	2,30	2,28	2,25	2,23	2,21	2,18	2,16
10	3,29	2,92	2,73	2,61	2,52	2,46	2,41	2,38	2,35	2,32	2,28	2,24	2,20	2,18	2,16	2,13	2,11	2,08	2,06
11	3,23	2,86	2,66	2,54	2,45	2,39	2,34	2,30	2,27	2,25	2,21	2,17	2,12	2,10	2,08	2,05	2,03	2,00	1,97
12	3,18	2,81	2,61	2,48	2,39	2,33	2,28	2,24	2,21	2,19	2,15	2,10	2,06	2,04	2,01	1,99	1,96	1,93	1,90
13	3,14	2,76	2,56	2,43	2,35	2,28	2,23	2,20	2,16	2,14	2,10	2,05	2,01	1,98	1,96	1,93	1,90	1,88	1,85
14	3,10	2,73	2,52	2,39	2,31	2,24	2,19	2,15	2,12	2,10	2,05	2,01	1,96	1,94	1,91	1,89	1,86	1,83	1,80
15	3,07	2,70	2,49	2,36	2,27	2,21	2,16	2,12	2,09	2,06	2,02	1,97	1,92	1,90	1,87	1,85	1,82	1,79	1,76
16	3,05	2,67	2,46	2,33	2,24	2,18	2,13	2,09	2,06	2,03	1,99	1,94	1,89	1,87	1,84	1,81	1,78	1,75	1,72
17	3,03	2,64	2,44	2,31	2,22	2,15	2,10	2,06	2,03	2,00	1,96	1,91	1,86	1,84	1,81	1,78	1,75	1,72	1,69
18	3,01	2,62	2,42	2,29	2,20	2,13	2,08	2,04	2,00	1,98	1,93	1,89	1,84	1,81	1,78	1,75	1,72	1,69	1,66
19	2,99	2,61	2,40	2,27	2,18	2,11	2,06	2,02	1,98	1,96	1,91	1,86	1,81	1,79	1,76	1,73	1,70	1,67	1,63
20	2,97	2,59	2,38	2,25	2,16	2,09	2,04	2,00	1,96	1,94	1,89	1,84	1,79	1,77	1,74	1,71	1,68	1,64	1,61
21	2,96	2,57	2,36	2,23	2,14	2,06	2,02	1,98	1,95	1,92	1,87	1,83	1,78	1,75	1,72	1,69	1,66	1,62	1,59
22	2,95	2,56	2,35	2,22	2,13	2,06	2,01	1,97	1,93	1,90	1,86	1,81	1,76	1,73	1,70	1,67	1,64	1,60	1,57
23	2,94	2,55	2,34	2,21	2,11	2,05	1,99	1,95	1,92	1,89	1,84	1,80	1,74	1,72	1,69	1,66	1,62	1,59	1,55
24	2,93	2,54	2,33	2,19	2,10	2,04	1,98	1,94	1,91	1,88	1,83	1,78	1,73	1,70	1,67	1,64	1,61	1,57	1,53
25	2,92	2,53	2,32	2,18	2,09	2,02	1,97	1,93	1,89	1,87	1,82	1,77	1,72	1,69	1,66	1,63	1,59	1,56	1,52
26	2,91	2,52	2,31	2,17	2,08	2,01	1,96	1,92	1,88	1,86	1,81	1,76	1,71	1,68	1,65	1,61	1,58	1,54	1,50
27	2,90	2,51	2,30	2,17	2,07	2,00	1,95	1,91	1,87	1,85	1,80	1,75	1,70	1,67	1,64	1,60	1,57	1,53	1,49
28	2,89	2,50	2,29	2,16	2,06	2,00	1,94	1,90	1,87	1,84	1,79	1,74	1,69	1,66	1,63	1,59	1,56	1,52	1,48
29	2,89	2,50	2,28	2,15	2,06	1,99	1,93	1,89	1,86	1,83	1,78	1,73	1,68	1,65	1,62	1,58	1,55	1,51	1,47
30	2,88	2,49	2,28	2,14	2,05	1,98	1,93	1,88	1,85	1,82	1,77	1,72	1,67	1,64	1,61	1,57	1,54	1,50	1,46
40	2,84	2,44	2,23	2,09	2,00	1,93	1,87	1,83	1,79	1,76	1,71	1,66	1,61	1,57	1,54	1,51	1,47	1,42	1,38
60	2,79	2,39	2,18	2,04	1,95	1,87	1,82	1,77	1,74	1,71	1,66	1,60	1,54	1,51	1,48	1,44	1,40	1,35	1,29
120	2,75	2,35	2,13	1,99	1,90	1,82	1,77	1,72	1,68	1,65	1,60	1,55	1,48	1,45	1,41	1,37	1,32	1,26	1,19
∞	2,71	2,30	2,08	1,94	1,85	1,77	1,72	1,67	1,63	1,60	1,55	1,49	1,42	1,38	1,34	1,30	1,24	1,17	1,00

Anexo 6. Datos demográficos de género (A), edad (B) y nacionalidad (C) del análisis sensorial de discriminación dúo- trío.



Anexo 7. Datos demográficos de género (A), edad (B) y nacionalidad (C) del análisis sensorial afectivo de preferencia.

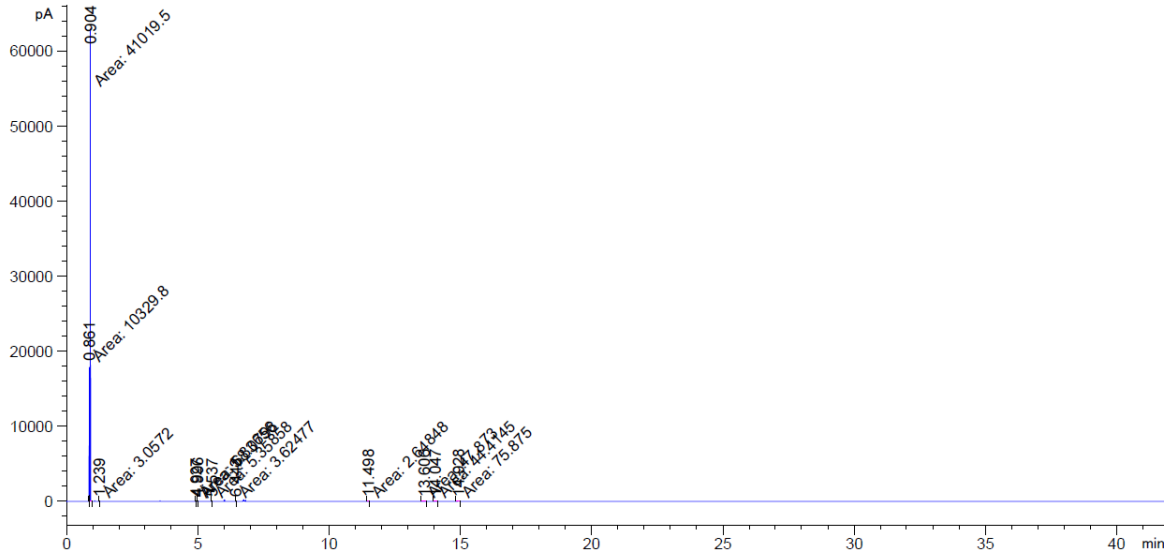
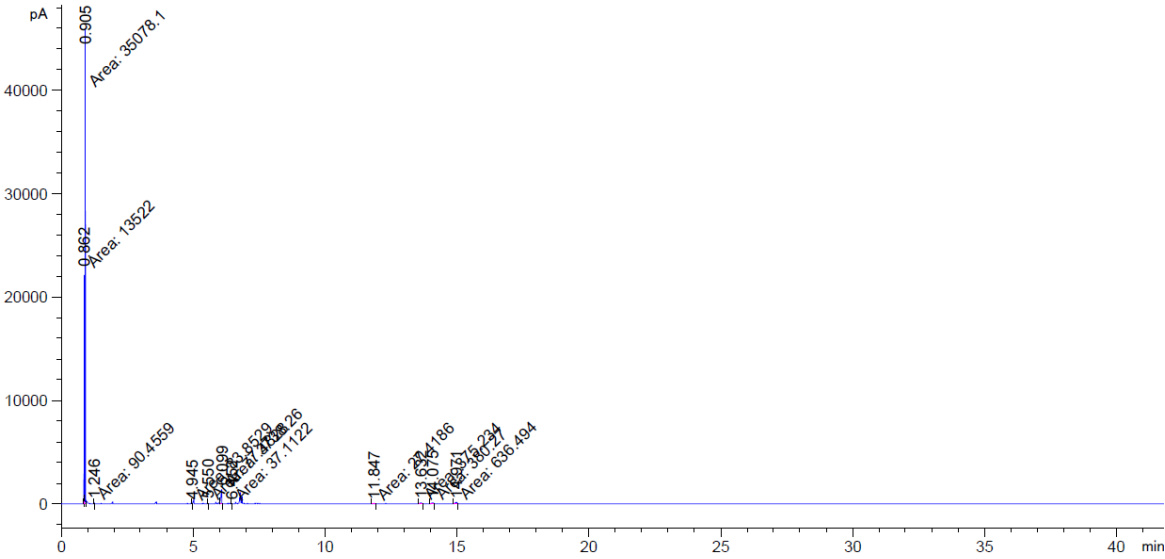


Anexo 8. Tabla de valores críticos para Chi-cuadrado.

<i>t</i> -tailed	α	Probability Under H_0 that $\chi^2 \geq$ chi-square				
		.20	.10	.05	.02	.01
1	1.64	2.71	3.84	5.41	6.64	10.83
2	3.22	4.60	5.99	7.82	9.21	13.82
3	4.64	6.25	7.82	9.84	11.34	16.27
4	5.99	7.78	9.49	11.67	13.28	18.46
5	7.29	9.24	11.07	13.39	15.09	20.52
6	8.56	10.64	12.59	15.03	16.81	22.46
7	9.80	12.02	14.07	16.62	18.48	24.32
8	11.03	13.36	15.51	18.17	20.09	26.12
9	12.24	14.68	16.92	19.68	21.67	28.88
10	13.44	15.99	18.31	21.16	23.21	29.59
11	14.63	17.28	19.68	22.62	24.72	31.26
12	15.81	18.55	21.03	24.05	26.22	32.91
13	16.98	19.81	22.36	25.47	27.69	34.53
14	18.15	21.06	23.68	26.87	29.14	36.12
15	19.31	22.31	25.00	28.26	30.58	37.70
16	20.46	23.54	26.30	29.63	32.00	39.29
17	21.62	24.77	27.59	31.00	33.41	40.75
18	22.76	25.99	28.87	32.35	34.80	42.31
19	23.90	27.20	30.14	33.69	36.19	43.82
20	25.04	28.41	31.41	35.02	37.57	45.32
21	26.17	29.62	32.67	36.34	38.93	46.80
22	27.30	30.81	33.92	37.66	40.29	48.27
23	28.43	32.01	35.17	38.97	41.64	49.73
24	29.55	33.20	36.42	40.27	42.98	51.18
25	30.68	34.38	37.65	41.57	44.31	52.62
26	31.80	35.56	38.88	42.86	45.64	54.05
27	32.91	36.74	40.11	44.14	46.96	55.48
28	34.03	37.92	41.34	45.42	48.28	56.89
29	35.14	39.09	42.56	46.69	49.59	58.30
30	36.25	40.26	43.77	47.96	50.89	59.70

Reprinted from E.S. Pearson and C.M. Thompson, Table of percentage points of the chi-square distribution, *Biometrika*, Vol. 52, 1941, by permission of the Biometrika Trustees.

Anexo 9. Cromatogramas de queso keferinado con fitosterol.



Anexo 10. Cromatogramas de queso keferinado sin fitosterol.

