

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

**OBTENCIÓN DE UN ALIMENTO FUNCIONAL MEDIANTE LA
LIOFILIZACIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN DE UN
PRODUCTO GENERADO A PARTIR DE LA MICROBIOTA DEL
KÉFIR**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN
CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

PRESENTA:

M.I.A ALICIA AGUEDA CONDE ISLAS

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. GUADALUPE LUNA SOLANO

CODIRECTOR DE TESIS:
DRA. MARIBEL JIMÉNEZ FERNÁNDEZ



RESUMEN

Conde Islas Alicia Agueda. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Instituto Tecnológico de Orizaba. Enero 2020. **OBTENCIÓN DE UN ALIMENTO FUNCIONAL MEDIANTE LA LIOFILIZACIÓN Y SECADO POR ASPERSIÓN DE UN PRODUCTO GENERADO A PARTIR DE LA MICROBIOTA DEL KÉFIR.** Asesores: Dra. Guadalupe Luna Solano, Dra. Maribel Jiménez Fernández.

El Kéfir se encuentra clasificado dentro del grupo de leches fermentadas consideradas como probióticas y que forman parte de la clasificación de alimentos funcionales, los cuales se caracterizan por la presencia en su composición de microorganismos vivos que proveen efectos favorables a la salud de quien los consume. Además, de aportar grandes contenidos nutricionales. Para su elaboración es necesario contar con un cultivo iniciador conocido como granos de Kéfir o microbiota de Kéfir; la cual, crece solamente de granos preexistentes y su composición dependerá del área, calidad y tipo de leche usada para su reproducción. Dificultando la obtención, de una cultura uniforme y definida para la industria a escala del Kéfir. Así también, el Kéfir al ser sometido a una fermentación ácido-alcohólica que; si no es detenida, cuando el producto alcanza las características idóneas, el producto final sufrirá una sobre acidificación, deterioro y alteración, que comprometerá su calidad. El secado por liofilización y el secado por aspersion son una alternativa para la obtención de productos deshidratados estables que conserven sus características y componentes naturales además de, reducir su peso y volumen, minimizando los costos de transporte y almacenamiento. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue aplicar el proceso de secado por liofilización y secado por aspersion para la obtención de un producto viable a partir de la microbiota del kéfir. La reproducción de la microbiota fue llevada a 26°C en la leche con grasa vegetal rehidratada y ultra pasteurizada y la caracterización de la microbiota obtenida, permitió identificar una alta viabilidad de microorganismos capaces de ser sometidos al secado por liofilización. Para el secado por liofilización fue utilizado un diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$, los factores y niveles analizados fueron: tiempo de congelamiento (3-9h), temperatura de congelamiento (-20-80°C), presión (0.2-0.8mbar), y tiempo de liofilización (5-20h). El cambio máximo en el rango y el análisis de varianza de una sola vía mostraron que el tiempo de liofilización tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en las variables de respuesta como la humedad y la actividad de agua, y la presión tuvo un efecto significativo en la diferencia de color y supervivencia de los microorganismos probióticos como las bacterias ácido lácticas y levaduras. Las mejores condiciones de

liofilización fueron, tiempo de congelamiento de 3 h, Temperatura de congelamiento de -20°C, Presión de 0.6 mbar and tiempo de liofilización de 15 h. bajo estas condiciones se pudo obtener un producto con $X < 6\%$, $a_w < 0.2$, bacterias ácido-lácticas $> 8.5 \text{ Log (UFC/g)}$ y levaduras $> 8.6 \text{ Log (UFC /g)}$. Las pruebas de almacenamiento fueron realizadas mediante un diseño de experimentos factorial 2^3 en donde se consideraron 2 variables cualitativas y una cuantitativa, al término del almacenamiento se determinó que el producto debe ser almacenado a una temperatura de 4°C, en bolsas de aluminio durante un periodo no mayor a 3 meses; aunque el producto presento características dentro del límite permisible hasta los 120 días que duro el experimento.

El secado por aspersión fue llevado a cabo en base a un diseño de experimentos ortogonal L_93^3 , considerando como factores a la temperatura del aire de entrada (125, 135 y 145°C), % de concentración de maltodextrina (20, 30 y 40) y temperatura del aire de salida (70, 75 y 80°C). El cambio máximo en el rango de los resultados mostro que la temperatura del aire de salida contribuía en mayor grado al % de humedad de la muestra, también este cambio en el rango y el análisis de varianza de una sola vía mostraron que la concentración de maltodextrina tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en las variables de respuesta como la actividad de agua, la diferencia de color y el % de acidez titulable, a su vez este material de pared afecto significativamente ($p < 0.1$) al contenido de levaduras y en el caso de las bacterias acido lácticas el cambio fue visto en rango máximo en donde la supervivencia de estos microorganismos se ve afectado también por la concentración de maltodextrina empleada. Las mejores condiciones de operación fueron a una temperatura del aire de entrada de 145°C, Concentración de maltodextrina 40% y una temperatura del aire de salida de 75°C. Bajo estas condiciones se obtuvo un polvo con $X < 6\%$, $a_w < 0.5$, bacterias ácido lácticas $> 7 \text{ Log (UFC/g)}$ y levaduras $> 7 \text{ Log (UFC /g)}$.

ABSTRACT

Conde Islas Alicia Agueda. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Instituto Tecnológico de Orizaba. January 2020. **OBTAINING A FUNCTIONAL FOOD BY FREEZE-DRYING AND SPRAY-DRYING A PRODUCT GENERATED FROM THE MICROBIOTA OF THE**

Kefir is classified within the group of fermented milks considered as probiotics and are part of the classification of functional foods, which are characterized by the presence in their composition of living microorganisms that provide favorable effects to the health of those who consume them. In addition to providing high nutritional content. For its elaboration it is necessary to have a starter culture known as Kefir grains or Kefir microbiota; which only grows from pre-existing grains and its composition will depend on the area, quality and type of milk used for its reproduction. Difficulting the obtaining, of a uniform and defined culture for the industry to scale of the Kefir. Also, the kefir to be subjected to an acidic-alcoholic fermentation that, if not stopped, when the product has reached the ideal characteristics, the final product will suffer an over acidification, deterioration and alteration, which will compromise its quality. Freeze-drying and spray-drying are an alternative for obtaining stable dehydrated products that retain their natural characteristics and components, as well as reducing their weight and volume, minimizing transport and storage costs. Therefore, the objective of this work was to apply the freeze-drying and spray-drying process to obtain a viable product from the microbiota of the kefir. The reproduction of the microbiota was taken to 26°C in the milk with rehydrated and ultra-pasteurized vegetable fat and the characterization of the obtained microbiota, allowed to identify a high viability of microorganisms able to be submitted to the drying by lyophilization. For lyophilization drying, an orthogonal $L_{16}4^4$ experiment design was used. The factors and levels analyzed were: freezing time (3-9h), freezing temperature (-20-80°C), pressure (0.2-0.8mbar), and lyophilization time (5-20h). Maximum change in range and one-way analysis of variance showed that freeze drying time had a significant effect ($p < 0.05$) on response variables such as humidity and water activity, and pressure had a significant effect on color difference and survival of probiotic microorganisms such as lactic acid bacteria and yeasts. The best freeze-drying conditions were 3 h freezing time, -20°C freezing temperature, 0.6 mbar pressure and 15 h freeze-drying time. Under these conditions a product with $X < 6\%$, $a_w < 0.2$, lactic acid bacteria > 8.5 Log (CFU/g) and yeasts > 8.6 Log (CFU/g) could be obtained. The storage tests were carried out by means of a design of factorial experiments 23 in which 2

qualitative and one quantitative variables were considered, at the end of the storage it was determined that the product must be stored at a temperature of 4°C, in aluminum bags during a period not greater than 3 months; although the product presented characteristics within the permissible limit until the 120 days that the experiment lasted.

Spray drying was carried out based on an orthogonal L_93^3 experiment design, considering as factors the inlet air temperature (125, 135 and 145°C), % maltodextrin concentration (20, 30 and 40) and outlet air temperature (70, 75 and 80°C). The maximum change in the range of the results showed that the outlet air temperature contributed to a greater degree to the % humidity of the sample, also this change in the range and the one-way variance analysis showed that the maltodextrin concentration had a significant effect ($p < 0.05$) in response variables such as water activity, color difference and titratable acidity %, in turn this wall material significantly affected ($p < 0.1$) the yeast content and in the case of lactic acid bacteria the change was seen in maximum range where the survival of these microorganisms is also affected by the concentration of maltodextrin used. The best operating conditions were an inlet air temperature of 145°C, maltodextrin concentration of 40% and an outlet air temperature of 75°C. Under these conditions a powder was obtained with $X < 6\%$, $a_w < 0.5$, lactic acid bacteria $> 7 \text{ Log (CFU/g)}$ and yeasts $> 7 \text{ Log (CFU/g)}$.

Esta tesis forma parte del proyecto “Obtención de un alimento funcional mediante la liofilización y secado por aspersion de un producto generado a partir de la microbiota del Kéfir” desarrollado en el Instituto Tecnológico de Orizaba en el periodo enero 2016 a enero 2020. Con la finalidad de que los resultados de esta investigación sean fuente de información para futuros trabajos, se enlistan las publicaciones y congresos derivados de este estudio.

PUBLICACIONES

- 2019 Alicia Agueda Conde-Islas, Maribel Jiménez-Fernández, Denis Cantú-Lozano, Galo Rafael Urrea-García and Guadalupe Luna-Solano. Effect of freeze-drying process on the physicochemical and microbiological properties of Mexican Kefir grains. *Processes*, 7(3), 127.
- 2019 Alicia Agueda Conde-Islas. Búlgaros, bebida de leche fermentada obligada en nuestra infancia. Publicado en el libro “De costa a costa, la unión hace la ciencia” del Gobierno del estado de Veracruz, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Consejo Veracruzano de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico.

PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

- 2016 Efecto de las condiciones de fermentación durante la obtención de biomasa de Kéfir. Presentación en el I Encuentro de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería Delegación Oaxaca-SMBBO, Tuxtepec, Oaxaca México.
- 2017 Influence of freeze-drying on the physicochemical characteristics and microbiological properties of Mexican Kefir grains. Presentación en el 31st EFFoST International Conference Food Science and Technology Challenges for the 21st Century - Research to Progress Society. | Melia Sitges, España.
- 2019 Effect of the fermentation conditions for the growth of the microbiota of Kefir. Presentación en el IFT (Food Technology Institute) New Orleans, LA, USA.

Contenido

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVO GENERAL.....	3
OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
CAPÍTULO 1. SINTESIS BIBLIOGRÁFICA.....	4
1.1 Alimentos funcionales	4
1.1.1. El mercado de los alimentos funcionales	4
1.2 Probióticos.....	5
1.2.1 Productos lácteos como vehículo de microorganismos probióticos	6
1.2.2 Beneficios de los productos lácteos fermentados probióticos	6
1.3 Kéfir	7
1.3.1 Composición, estructura y formación de los granos de Kéfir.....	8
1.3.1.1 Granos de Kéfir.....	8
1.3.1.2 Formación de los granos de Kéfir.....	10
1.3.1.3 Propagación del cultivo iniciador del Kéfir	11
1.3.2 Producción de Kéfir.....	11
1.3.2.1 Métodos de producción de Kéfir.....	11
1.3.3 Beneficios del Kéfir	12
1.4 Fermentación	13
1.5 Proceso de secado	13
1.5.1 Secado por liofilización	14
1.5.1.1 Etapas del secado por liofilización	15
1.5.2 Secado por aspersión	16
1.5.2.1 Etapas del secado por aspersión	17
1.6 Encapsulación.....	18
1.7 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas en los alimentos deshidratados	20
1.7.1 Humedad	20
1.7.2 Actividad de agua (a_w).....	21
1.7.3 Color	22
1.7.4 % de acidez y pH	24

1.7.5	Bacterias acido-lácticas y levaduras.....	24
1.8	Almacenamiento	25
1.8.1	Empaque al vacío.....	26
1.8.2	Empaque en atmósfera modificada.....	26
1.9	Estudios realizados.....	26
1.10	Diseño experimental	29
1.10.1	Diseños de experimentos según Taguchi	30
1.10.2	Condiciones óptimas según Taguchi.....	32
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS		33
2.1	Metodología general	33
2.2	Materia prima	35
2.3	Selección y acondicionamiento de la muestra	35
2.4	Fermentación	37
2.5	Reproducción de la microbiota	38
2.6	Proceso de secado por liofilización	39
2.6.1	Diseño de experimentos	40
2.6.2	Análisis estadístico.....	42
2.7	Proceso de secado por aspersión.....	42
2.7.1	Diseño de experimentos	43
2.7.2	Análisis estadístico.....	45
2.8	Análisis fisicoquímicos	45
2.8.1	Humedad y solidos totales.....	45
2.8.2	Actividad de agua (a_w).....	46
2.8.3	Color	47
2.8.4	% acidez y pH	47
2.9	Análisis microbiológicos.....	48
2.9.1	Determinación de bacterias acido lácticas	49
2.9.2	Determinación de levaduras	49
2.10	Almacenamiento de la microbiota de Kéfir liofilizada.....	49
2.10.1	Diseño de experimentos	50
2.10.2	Empaque de la microbiota deshidratada	51
2.11	Condiciones óptimas propuestas por Taguchi para el proceso de secado por liofilización y secado por aspersión.....	52
2.11.1	Validación de las condiciones propuestas.....	52
2.12	Error relativo.....	52
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES		54

Parte I Resultados experimentales del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir	54
3.1 Acondicionamiento de la muestra	54
3.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la microbiota de Kéfir	54
3.3 Fermentación inicial	56
3.3.1 Fase de crecimiento	57
3.4 Reproducción de la microbiota	62
3.5 Secado por liofilización	63
3.5.1 Humedad y actividad de agua en la microbiota de Kéfir liofilizada	63
3.5.1.1 Análisis estadístico del contenido de humedad	65
3.5.1.2 Modelo matemático para predecir la humedad	65
3.5.1.3 Análisis estadístico de la actividad de agua	67
3.5.1.4 Modelo matemático para predecir la actividad de agua	68
3.5.2 Parámetros de color (L , a y b) en la microbiota de Kéfir liofilizada	69
3.5.2.1 Análisis estadístico del contenido de los parámetros de color	70
3.5.4 Diferencia de color	72
3.5.4.1 Análisis estadístico de la diferencia de color	73
3.5.4.2 Modelo matemático para predecir la diferencia de color	73
3.5.3 Bacterias acido-lácticas	75
3.5.3.1 Análisis estadístico del contenido de bacterias acido-lácticas	76
3.5.3.2 Modelo matemático del contenido de bacterias acido-lácticas	77
3.5.4 Levaduras en la microbiota de Kéfir liofilizada	78
3.5.4.1 Análisis estadístico del contenido de bacterias acido-lácticas	79
3.5.4.2 Modelo matemático del contenido de levaduras	80
3.6 Condiciones óptimas según Taguchi	83
3.6.1 Validación de las condiciones óptimas del proceso de secado por liofilización en la microbiota de Kéfir	86
3.7 Almacenamiento de la microbiota de Kéfir liofilizada	86
3.7.1 Humedad	87
3.7.2 Actividad de agua	89
3.7.3 Diferencia de color	91
3.7.4 Diferencia de peso (w)	94
3.7.5 Análisis microbiológicos	95
Parte II Resultados experimentales del proceso de secado por aspersion del Kéfir	97
3.8 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del Kéfir	97
3.9 Secado por aspersion del Kéfir	98

3.9.1	Humedad y actividad de agua en el Kéfir deshidratado.....	99
3.9.1.1	Análisis estadístico del contenido de humedad.....	100
3.9.1.2	Modelo matemático para predecir la humedad.....	101
3.9.1.3	Análisis estadístico de la actividad de agua.....	102
3.9.1.4	Modelo matemático para predecir la actividad de agua	103
3.9.2	Parámetros de color en el Kéfir deshidratado	104
3.9.2.1	Análisis estadístico del contenido de los parámetros de color	105
3.9.3	Diferencia de color	106
3.9.3.1	Análisis estadístico de la diferencia de color	107
3.9.3.2	Modelo matemático para predecir la diferencia de color	108
3.9.4	Acidez titulable	109
3.9.4.1	Análisis estadístico del contenido de acidez.....	110
3.9.4.2	Modelo matemático del contenido de acidez	111
3.9.5	Bacterias ácido-lácticas en el Kéfir deshidratado.....	112
3.9.5.1	Análisis estadístico del contenido de bacterias ácido-lácticas	112
3.9.5.2	Modelo matemático del contenido de bacterias ácido-lácticas	113
3.9.6	Levaduras en el Kéfir deshidratado	114
3.9.6.1	Análisis estadístico del contenido de levaduras	115
3.9.6.2	Modelo matemático del contenido de levaduras.....	116
3.10	Optimización según Taguchi	118
3.10.1	Validación de las condiciones óptimas del proceso de secado por aspersión del Kéfir 121	
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	122
	REFERENCIAS	124

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Factores y niveles para el diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$ del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir	41
Tabla 2.2 Datos codificados para el diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$	41
Tabla 2.3 Factores y niveles para el diseño de experimentos ortogonal L_93^3 del proceso de secado por aspersión del Kéfir	44
Tabla 2.4 Datos codificados para el diseño de experimentos ortogonal L_93^3	44
Tabla 2.5 Factores y niveles para el diseño de experimentos factorial del análisis de almacenamiento de la microbiota del Kéfir	50
Tabla 2.6 Datos codificados del diseño de experimentos factorial 2^3 para el análisis de almacenamiento de la microbiota de Kéfir	51
Tabla 3.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la microbiota de Kéfir	55
Tabla 3.2 Resultados de los parámetros de color L , a , b y ΔE	57
Tabla 3.3 Contenido de microorganismos probióticos en 4 diferentes medios de cultivo	58
Tabla 3.4 Propiedades fisicoquímicas de la fermentación de kéfir en el medio de cultivo No. 1	58
Tabla 3.5 Propiedades fisicoquímicas de la fermentación de kéfir en el medio de cultivo No. 3	59
Tabla 3.6 Cinética de crecimiento en medio de cultivo No. 1	59
Tabla 3.7 Cinética de crecimiento en medio de cultivo No. 3	60
Tabla 3.8 Efecto de distintos medios de cultivo sobre el incremento de la biomasa	62
Tabla 3.9 Promedio de crecimiento de la biomasa en tres medios específicos	63
Tabla 3.10 Valores experimentales para las variables de respuesta $\% X$ y a_w	64
Tabla 3.11 Análisis de varianza la variable de respuesta $\% X$	65
Tabla 3.12 Análisis de varianza de la variable de respuesta a_w	68
Tabla 3.13 Valores experimentales para los parámetros de color L , a y b	70
Tabla 3.14 Análisis de varianza de los parámetros de color (L , a , b)	71
Tabla 3.15 Valores experimentales para ΔE	72
Tabla 3.16 Análisis de varianza de la variable de respuesta ΔE	73
Tabla 3.17 Valores experimentales para las UFC/g de Bacterias ácido lácticas	76
Tabla 3.18 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de BAL	76
Tabla 3.19 Valores experimentales para las UFC/g de Levaduras	79

Tabla 3.20 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de Levaduras	80
Tabla 3.21 Datos experimentales (Exp-R) y resultados predichos (Pre-R) de la microbiota de Kéfir liofilizada	82
Tabla 3.22 Variables de respuesta seleccionadas y el valor objetivo esperado	83
Tabla 3.23 Factores y niveles óptimos para la liofilización de la microbiota de Kéfir	85
Tabla 3.24 Resultados de la validación experimental del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir	86
Tabla 3.25 Análisis de Varianza de la variable Y_1 (%contenido de humedad) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento	89
Tabla 3.26 Análisis de varianza de la variable Y_2 (a_w) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento	91
Tabla 3.27 Análisis de Varianza de la variable Y_3 (ΔE) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento	93
Tabla 3.28 Análisis de Varianza de la variable Y_4 (w) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento	95
Tabla 3.29 Análisis microbiológicos de la microbiota de Kéfir liofilizada al inicio y final del almacenamiento	96
Tabla 3.30 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del Kéfir	97
Tabla 3.31 Valores experimentales para las variables de respuesta % X y a_w	99
Tabla 3.32 Análisis del % de humedad en el producto final deshidratado de Kéfir	101
Tabla 3.33 Análisis de la actividad de agua (a_w) en el producto final deshidratado de Kéfir	103
Tabla 3.34 Valores experimentales para los parámetros de color L , a y b	105
Tabla 3.35 Análisis de varianza de los parámetros de color (L , a , b)	105
Tabla 3.36 Valores experimentales para ΔE	107
Tabla 3.37 Análisis de ΔE en el producto final deshidratado de Kéfir	107
Tabla 3.38 Valores experimentales para los parámetros de color L , a y b	110
Tabla 3.39 Análisis de varianza de la acides total (% ácido láctico)	110
Tabla 3.40 Valores experimentales para las UFC/g de Bacterias ácido lácticas	112
Tabla 3.41 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de BAL	113
Tabla 3.42 Valores experimentales para las levaduras	115
Tabla 3.43 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de levaduras	115

Tabla 3.44 Datos experimentales (Exp-R) y resultados predichos (Pre-R) del Kéfir deshidratado por secado por aspersión	117
Tabla 3.45 Variables de respuesta seleccionadas y el valor objetivo esperado	118
Tabla 3.46 Factores y niveles óptimos para la liofilización de la microbiota de Kéfir	120
Tabla 3.47 Resultados de la validación experimental del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Kéfir y microbiota de Kéfir	8
Figura 1.2 Granos de Kéfir	9
Figura 1.3 Micrografía electrónica del grano de Kéfir (Glenn, 2006)	10
Figura 1.4 Diagrama de las fases del agua (Tejeda, 2018)	15
Figura 1.5 Fases de la liofilización (Orrego, 2017)	16
Figura 1.6 Partes que conforman un secador por aspersion (Fuente: CIMA INDUSTRIES INC.)	17
Figura 1.7 Teoría de los colores opuestos (Hunter Lab. 2012)	23
Figura 1.8 Diagrama Hunter L, a y b (Hunter Lab)	23
Figura 2.1 Metodología general aplicada para el secado de la microbiota del Kéfir y Kéfir	33
Figura 2.2 Cultivo iniciador de Kéfir	35
Figura 2.3 Acondicionamiento de la muestra	36
Figura 2.4 Microbiota de Kéfir	36
Figura 2.5 Selección de granos de Kéfir	36
Figura 2.6 Distintas formas y tamaños de la microbiota de Kéfir	36
Figura 2.7 a) Maltodextrina y b) Kéfir acondicionado con maltodextrina 20, 30 y 40%	37
Figura 2.8 Fermentación para la elaboración del Kéfir	38
Figura 2.9 Microbiota reproducida en el laboratorio	39
Figura 2.10 Liofilizador capacidad de 12 l Marca Labconco Modelo 742004	39
Figura 2.11 Ultracongelador So-low Modelo U85-13	40
Figura 2.12 Mini spray dryer Mca. Büchi Modelo B-290	43
Figura 2.13 Compresor Pretul	43
Figura 2.14 Termobalanza Sartorius	46
Figura 2.15 Medidor de a_w AQUA LAB	46
Figura 2.16 MiniScan XE Plus Hunter Lab	47
Figura 2.17 colorímetro ColorQuest XE HunterLab	47
Figura 2.18 Potenciómetro pH10 Marca Conductronic	48
Figura 2.19 Siembra por el método de Placa vertida	49
Figura 2.20 Empaque de polietileno y metalizado	52
Figura 3.1 Acondicionamiento de la muestra	54

Figura 3.2 Granos de Kéfir obtenidos en el laboratorio	55
Figura 3.3 Microbiota de Kéfir y diagrama Hunter L, a, b	56
Figura 3.4 Efecto de la temperatura sobre el pH y el contenido de sólidos durante la fermentación de Kéfir	56
Figura 3.5 Cinética de crecimiento Log UFC/ml BAL	60
Figura 3.6 Cinética de crecimiento Log UFC/ml Levaduras	61
Figura 3.7 Fase de crecimiento de las bacterias ácido lácticas y levaduras presentes en el Kéfir	62
Figura 3.8 Contenido de humedad (% X) predicho a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión	67
Figura 3.9 a_w predicho a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión	69
Figura 3.10 ΔE predicho a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión	74
Figura 3.11 Muestra de color de la microbiota de Kéfir: (a) fresca, y liofilizada (b) Experimento15 (menor diferencia de color), y (c) Experimento 11 (máxima diferencia de color)	75
Figura 3.12 Valor predicho de log (UFC/g) de BAL a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión	78
Figura 3.13 Valor predicho de log (UFC/g) de Levaduras a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión	81
Figura 3.14 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el % de humedad	84
Figura 3.15 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para a_w	84
Figura 3.16 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas	84
Figura 3.17 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de Levaduras	85
Figura 3.18 Evolución del contenido de humedad durante el almacenamiento	87
Figura 3.19 Evolución del contenido de humedad durante el almacenamiento: a) vacío y b) N_2	88
Figura 3.20 Evolución de la actividad de agua durante el almacenamiento	90
Figura 3.21 Evolución de la actividad de agua (a_w) durante el almacenamiento a) vacío y b) N_2	90
Figura 3.22 Evolución de la diferencia de color (ΔE) durante el almacenamiento	92

Figura 3.23 Evolución de la diferencia de color (ΔE) durante el almacenamiento a) vacío y b) N_2	93
Figura 3.24 Evolución del peso (w) durante el almacenamiento	94
Figura 3.25 Evolución del peso (w) durante el almacenamiento a) vacío y b) N_2	95
Figura 3.26 Kéfir	97
Figura 3.27 Kéfir y diagrama Hunter L, a, b	98
Figura 3.28 Contenido de humedad (% X) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina	102
Figura 3.29 Actividad de agua (a_w) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina	104
Figura 3.30 Diferencia de color (ΔE) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina	108
Figura 3.31 Muestras visuales del color obtenido en el Kéfir deshidratado	109
Figura 3.32 % del contenido de acides (expresado como ácido láctico) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina	111
Figura 3.33 Contenido de bacterias ácido-lácticas (log (UFC/g) a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina	114
Figura 3.34 Contenido de levaduras (log (UFC/g) a diferentes niveles de temperatura de entrada y concentración de maltodextrina	116
Figura 3.35 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el % de humedad	119
Figura 3.36 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para a_w	119
Figura 3.37 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas	119
Figura 3.38 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de Levaduras	120

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, el enfoque de los consumidores hacia los alimentos ha cambiado drásticamente los gustos, preferencias, tendencias y necesidades se han ido modificando a lo largo del tiempo. El aumento de enfermedades y deficiencias nutricionales ha obligado al consumidor a buscar alimentos que, además de cumplir con su función principal; brinden beneficios adicionales, que sean nutritivos e incluso medicinales. Este interés ha abierto una puerta hacia la investigación de alimentos de valor agregado como los alimentos funcionales y fortificados. Dentro de estos alimentos funcionales se encuentran clasificados los denominados “probióticos”, alimentos que han incrementado su popularidad en el mercado de alimentos funcionales, dados los beneficios que brindan al consumidor, sobre una o más funciones del organismo, más allá de su efecto nutricional. Y para que, los probióticos puedan brindar beneficios a la salud del consumidos, es necesario que las cepas probióticas cuenten con una matriz específica que permita su supervivencia a lo largo del tracto intestinal, con una concentración al menos de 10 millones de unidades formadoras de colonias por gramo de producto (UFC/g), esto implica que los microorganismos deberán mantener su viabilidad durante todo el proceso de producción, almacenamiento, hasta su consumo. Actualmente, en el mercado existen una gran variedad de productos probióticos siendo los de mayor aceptación los derivados lácteos debido su consumo y composición nutricional, en especial el yogur y las leches fermentadas (Parvez et al., 2006) donde de acuerdo a Sanz & Dalmau (2008) esto se debe a que los lácteos constituyen un vehículo eficiente para los microorganismos probióticos al ser un medio de cultivo ideal para la multiplicación bacteriana además, de proteger al huésped de los elevados niveles de ácido que tiene el estómago (Santiago-López et al., 2015; Santillán-Urquiza *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2009).

Los productos lácteos fermentados se han asociado desde hace mucho tiempo a la dieta nutricional y a su capacidad de conferir beneficios a quien los consume regularmente (Bourrie *et al.*, 2016). Estos productos son elaborados mediante una fermentación que implica la acidificación de la leche causada por microorganismo propios del alimento. Esta acidificación funciona también, como un método biológico para conservar alimentos en donde los alimentos producidos por este método tienen un menos riesgo de contaminación (Marco et al., 2017). Además, la fermentación permite la retención y optimización de la viabilidad microbiana y la productividad, y simultáneamente preserva las propiedades probióticas (Ross et al. 2003). Esfuerzos actuales en investigación han permitido el

desarrollo y producción de diferentes productos lácteos fermentados de alto valor nutritivo (Panesar, 2011). Entre los alimentos funcionales considerados como probióticos se encuentran las leches fermentadas como el kéfir. El kéfir es una bebida probiótica que ha sido consumida por miles de años, y que actualmente ha tomado auge en los mercados de alimento funcionales, siendo tradicionalmente elaborado con leche, la cual es inoculada con un cultivo denominado “microbiota de kéfir” o “granos de kéfir”, responsable de llevar a cabo, la fermentación acido-alcohólica que otorga a esta bebida sus características organolépticas y nutricionales que le caracterizan. No obstante, esta microbiota crece solamente de granos preexistentes y su y composición dependerá del área, calidad y tipo de leche usada para su reproducción, dificultando así; la obtención, de una cultura uniforme y definida para la industria a escala del Kéfir. La liofilización es un método de secado que ofrece mayores ventajas que cualquier otro método en la deshidratación de alimentos sólidos que contienen microorganismos vivos como el consorcio de microorganismos que viven simbióticamente en la microbiota del Kéfir; ya que, el proceso permite obtener un alto grado de supervivencia, estabilidad microbiológica, alargando su vida útil y manteniendo las características del producto original. Por otra parte, el secado por aspersion en un método de secado que ofrece grandes ventajas para la deshidratación de líquidos como el Kéfir, al reducir en polvo el alimento por efecto de la temperatura en el proceso de secado, preservando su viabilidad microbiológica. Ambos métodos son una opción para la obtención de un producto viable para el mercado de alimentos funcionales, al permitir obtener productos homogéneos a partir de la microbiota y el Kéfir con una alta viabilidad, y estabilidad microbiológica, facilitando su conservación, transporte y almacenamiento.

JUSTIFICACIÓN

La microbiota de Kéfir y Kéfir son productos alimenticios complejos y altamente perecederos, debido en primer lugar al cultivo iniciador utilizado para su elaboración; pues la microbiota o granos de Kéfir crece solamente de granos preexistentes y su composición dependerá de la calidad y tipo del medio de cultivo utilizado, así como; del área, donde se obtenga el cultivo para su reproducción; todo ello sin contar, el tiempo y dedicación para su conservación y cuidado. Adicional a ello, para la elaboración del Kéfir es necesario llevar a cabo una fermentación ácido-alcohólica; la cual, si no es detenida cuando el producto ha alcanzado las características deseadas, se corre el riesgo de una sobre acidificación y deterioro del mismo; por lo que su periodo de vida útil es muy corto. Y aunque en la industria existen técnicas de conservación para este tipo de alimentos como son los métodos biológicos que inhiben el crecimiento bacteriano a través de la aplicación de bacteriocinas o los métodos físicos como la refrigeración en donde se mantiene al producto a temperaturas entre 2 y 5°C o la aplicación de rayos ultravioleta o ultrasonidos y la pasteurización y los métodos químicos en donde se adicionan al producto sustancias químicas para preservarlas. Al aplicar algunos de estos métodos de conservación se modificarán también las características del producto original. Por otra parte, se suman los problemas de logística y almacenamiento en el manejo de volumen junto con el incremento en costos que todo esto conlleva. Por todo lo anterior el proceso de secado de la microbiota de Kéfir y Kéfir posee grandes ventajas dentro de las cuales se encuentra que reduce su peso y volumen, así como también se minimiza los costos transporte y almacenamiento. Además, permite la estabilidad del producto debido a su bajo contenido de humedad y actividad de agua (a_w).

OBJETIVO GENERAL

Aplicar el proceso de secado por liofilización y secado por aspersión en la obtención de un producto viable a partir de la microbiota del Kéfir.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente la microbiota del Kéfir y Kéfir.
- Evaluar diferentes medios de cultivo y condiciones de fermentación para la maximización de la producción de la microbiota del Kéfir y viabilidad de los microorganismos probióticos presentes en él Kéfir.
- Establecer las condiciones de operación del proceso de secado por liofilización y secado por aspersión de la microbiota de Kéfir y Kéfir.
- Analizar el efecto del proceso de secado por liofilización sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del microbiota de Kéfir.
- Analizar el efecto de las condiciones de operación del proceso de secado por aspersión del Kéfir sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del producto obtenido.
- Evaluar el efecto del almacenamiento sobre las características fisicoquímicas y viabilidad de la microbiota de Kéfir liofilizada.

CAPÍTULO 1. SINTESIS BIBLIOGRÁFICA

1.1 Alimentos funcionales

El concepto de alimento funcional surge en Japón en la década de los 80'S (Arai, 1996), extendiéndose posteriormente a los Estados Unidos y Europa con el prestigio de que; la alimentación además de aportar los nutrientes necesarios debe promover beneficios a la salud (Jáuregui-lobera & Oliveras, 2018). Y aunque no existe una definición universalmente aceptada, autores como Diplock *et al.* (1999) y Ashwell (2004) los definen como aquel alimento que ejerce un efecto favorable sobre una, o más funciones fisiológicas del organismo más allá de su efecto nutricional, al mejorar el estado de bienestar y salud, reduciendo a su vez el riesgo de padecer una enfermedad. Aunque; de hecho, esta no es una idea nueva, durante siglos la humanidad ha aprovechado las propiedades de ciertos alimentos para tratar, mitigar o prevenir enfermedades; sin embargo, la gran cantidad de evidencia disponible sobre la relación entre la ingesta de alimentos y la incidencia de enfermedades ha llevado a un creciente interés en los alimentos y componentes alimenticios que aporten beneficios especiales al consumidor (Agrawal, 2005; Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001).

1.1.1. El mercado de los alimentos funcionales

En respuesta al creciente interés de los consumidores en productos saludables y naturales, la industria alimentaria ha desarrollado una variedad de nuevos productos denominados "alimentos funcionales" dicho interés ha favorecido su demanda, en el mercado global, en donde autores como Granato, et al, (2010) & Hennessy (2013) refieren que dicho mercado ha crecido de 33 millones de dólares en el año 2000 a 176 millones de dólares en el 2013; representando un 5% del mercado global de alimentos; en el cual, los alimentos probióticos comprenden el 60 y 70% del mercado total de alimentos funcionales (Kołozyn-Krajewskaa & Dolatowski, 2012; Holzapfel, 2006; Stanton et al., 2001). En el 2017 las ventas a nivel mundial de los alimentos funcionales/fortificados alcanzaron los 247 billones de dólares; los cuales, de manera global tuvieron una tasa de crecimiento en el valor de venta al por menor del 2%, siendo Estados Unidos el mayor mercado de alimentos y bebidas funcionales, aunque en Asia y Europa del Este las ventas siguen en aumento significativamente; Alemania, Francia, el Reino Unido y los Países Bajos representan el países más

importantes dentro del mercado de alimentos funcionales (Jago, 2009). Sin embargo, muchos otros mercados europeos están experimentando altas tasas de crecimiento, como las de los Países Bajos y España. Un ejemplo es el caso de la venta de bocadillos funcionales (functional snacks) proyectadas según la NBJ (2018) alcancen los 8.5 billones de dólares en 2020. Por lo que, el incremento en ventas y consumo de probióticos plantea a la industria de alimentos un mayor conocimiento científico para desarrollar nuevos métodos, optimizar la producción, conservación y asegurar la inocuidad y funcionalidad de los mismos.

1.2 Probióticos

El nacimiento del concepto de “probióticos” viene de las observaciones a principios del siglo XX hechas por Metchnikoff quien fue el primero, en sugerir los beneficios sobre la flora intestinal de las bacterias lácticas presentes en las leches fermentadas, afirmando la relación entre el consumo de la leche fermentada y la longevidad (Fuller, 1992). Los probióticos se encuentran clasificados dentro del grupo de alimentos funcionales. (Agrawal, 2005; Ferrer & Dalmau, 2001), este término proviene de la palabra griega “*pro bios*” la cual significa “para la vida” y se puede definir como una preparación o producto que contienen microorganismos vivos, identificables y en número suficiente que; al ser administrados en dosis suficientes, afectaran de manera favorable la salud del consumidor al mejorar el equilibrio microbiano intestinal (Anandharamakrishnan & Padma, 2015; Araya et al., 2002; Fuller, 1989); por su parte, la Comisión Europea los refiere como productos lácteos fermentados que contienen cultivos vivos de bacterias, que mejoran el equilibrio microbiano del cuerpo y por lo tanto reducen el riesgo de sufrir cierto tipo de infecciones (Webb, 2006).

Para que un probiótico sea eficaz, es necesario que posea diversas características; de acuerdo a Fuller (1992) este, debe tener la capacidad de operar y sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y formas, debe ser estable y viable durante largos periodos de almacenamiento, sobrevivir en el intestino, producir un efecto beneficioso en el huésped y escalable a nivel industrial.

El contenido de probióticos en los alimentos es expresado en unidades formadoras de colonias por gramo de producto, indicando así el número de microorganismos vivos presentes (Villanueva, 2015) por lo que; en orden de proveer beneficios, el alimento deberá

contener al menos 10 millones de unidades formadoras de colonias por gramo de producto (UFC/g); esto implica que los microorganismos probióticos deberán mantener su viabilidad y características durante todo el proceso de producción, almacenamiento y su consumo (Golowczyc *et al.*, 2010).

1.2.1 Productos lácteos como vehículo de microorganismos probióticos

Con el objetivo de que los probióticos puedan proporcionar beneficios a la salud, es requisito que las cepas probióticas cuenten con una matriz específica que garantice su óptima supervivencia a lo largo del tracto gastrointestinal. Actualmente, en el mercado existen una gran variedad de productos probióticos siendo los de mayor aceptación los derivados lácteos debido su consumo y composición nutricional, en especial el yogur y las leches fermentadas (Parvez *et al.*, 2006) donde de acuerdo a Sanz & Dalmau (2008) esto se debe a que los lácteos constituyen un vehículo eficiente para los microorganismos probióticos al ser un medio de cultivo ideal para la multiplicación bacteriana además, de proteger al huésped de los elevados niveles de ácido que tiene el estómago (Santiago-López *et al.*, 2015; Santillán-Urquiza *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2009).

1.2.2 Beneficios de los productos lácteos fermentados probióticos

Los productos lácteos fermentados se han asociado desde hace mucho tiempo a la dieta nutricional y a su capacidad de conferir beneficios a quien los consume regularmente (Bourrie *et al.*, 2016). Estos productos son elaborados mediante una fermentación que implica la acidificación de la leche causada por microorganismo propios del alimento. Esta acidificación funciona también, como un método biológico para conservar alimentos en donde los alimentos producidos por este método tienen un menor riesgo de contaminación (Marco *et al.*, 2017). Además, la fermentación permite la retención y optimización de la viabilidad microbiana y la productividad, y simultáneamente preserva las propiedades probióticas (Ross *et al.* 2003). Esfuerzos actuales en investigación han permitido el desarrollo y producción de diferentes productos lácteos fermentados de alto valor nutritivo (Panesar, 2011).

Los probióticos como organismos de fermentación combinan las imágenes positivas tanto de los probióticos como de los organismos de fermentación (Heller, 2001). En estudios

recientes se ha encontrado que las proteínas de los alimentos pueden ejercer otras funciones *in vivo*, por medio de sus péptidos con actividades biológicas (Korhonen, 2009), los cuales pueden ser liberados de la secuencia proteica por la acción de enzimas digestivas durante el tránsito intestinal o durante el proceso de fermentación de la leche o maduración de los quesos; donde, una vez liberados estos péptidos pueden ejercer un efecto fisiológico en el organismo (Foltz et al., 2007). Estudios previos como los realizados por Marco et al. (2017); Domínguez et al. (2014); Mcfarland (2006); Gill & Guarner (2004). (Parvez et al., 2006) han indicado los efectos benéficos que pueden causar los productos lácteos fermentados estos incluyen, entre otros: fortalecer el sistema inmunológico innato y adaptativo, proporcionando así una mejor protección contra las infecciones, mejorar la salud del sistema digestivo, participación en la prevención de la manifestación temprana de la hipertensión, reducción del colesterol, mejora de la tolerancia a la lactosa (Marco et al., 2017; Domínguez et al., 2014; Mcfarland, 2006; Gill & Guarner, 2004).

1.3 Kéfir

El Kéfir es un probiótico natural clasificado dentro del grupo leches fermentadas, que se produce tradicionalmente a partir de la adición de granos de Kéfir a la leche fresca (Erdogan et al., 2018; Otles & Cagindi, 2003) de un sabor ligeramente ácido, de consistencia viscosa, gaseosa, alcohólica (con menos de 1 g/100 de alcohol etílico) y espumosa, esta última característica le atribuye una sensación de burbuja en la boca que le otorga el nombre de *champagne* de los productos lácteos (Arslan, 2015; Sera et al., 2014; Gaware et al., 2011; Tratnik et al., 2006). Para su elaboración es necesario llevarla a cabo una fermentación láctica como alcohólica. Esta bebida tuvo sus orígenes en las montañas del Cáucaso y con el paso del tiempo se fue extendiendo hasta nuestros días en donde es producida tanto artesanal como comercialmente en todo el mundo, conocida también como kephir, kefer, knapon, kepi y kippi (Rosa et al., 2017; Nielsen et al., 2014; Sera et al., 2014; Gaware et al., 2011; Tratnik et al., 2006). Pogačić et al., 2013; Sarkar, 2007) (Figura 1.1).



Figura 1.1 Kéfir y microbiota de Kéfir

1.3.1 Composición, estructura y formación de los granos de Kéfir

La composición de los granos de Kéfir y Kéfir dependerá de la calidad, tipo de leche y del inóculo utilizados para la fermentación. Y aunque, durante la fermentación se llevan a cabo diferentes cambios en la composición de los ingredientes y nutrientes; los productos obtenidos al final de este proceso son: ácido láctico, acetaldehído, acetoina, diacetilo, etanol y CO₂ (Sekkal-Taleb, 2016); además, durante la fermentación de la leche, las vitaminas B1, B12, calcio soluble, aminoácidos, ácido fólico y vitamina K pueden incrementarse (Garofalo et al., 2015).

1.3.1.1 Granos de Kéfir

A diferencia de otros productos lácteos fermentados, como el yogur que, para su elaboración requiere únicamente de dos bacterias, la microbiología del Kéfir es mucha más compleja y se diferencia de otros productos lácteos fermentados por la necesidad de contar con un cultivo iniciador para poder llevar a cabo el proceso de fermentación conocido como “granos de Kéfir” (Figura 1.1) (Turkmen, 2017; Wszolek et al., 2006; Simova et al., 2002). Este cultivo inicial se asemeja a pequeños racimos de coliflor, siendo de tamaño variable (0.5 a 3.5 cm) de color blanco o amarillento, consistencia elástica, puede presentar forma estructurales irregulares, laminares, con lado liso y otro rugoso, enrolladas o convexas

(Rosa et al., 2017; Sarkar, 2008; Seydim *et al.*, 2000; Farnworth, 1999; Garrote *et al.*, 1997). Los granos de Kéfir son una entidad biológica fascinante (Nielsen *et al.*, 2014), pues representan la única comunidad microbiana de bacterias, levaduras y a veces mohos filamentosos, que conforman una compleja comunidad simbiótica y un ecosistema único en la naturaleza. Autores como Cui et al. (2013) y Simova et al. (2002) los describen como “organismos biológicamente vitales” con una estructura específica, que incrementa en cantidad y tamaño durante el proceso de fermentación, se propagan y transmiten sus propiedades a las siguientes generaciones de nuevos granos.



Figura 1.2 Granos de Kéfir

Están conformados generalmente por una flora microbiana de más de 50 diferentes especies de levaduras y bacterias asociadas simbióticamente dentro de una matriz de polisacáridos y proteínas que recibe el nombre de kefirano (Pogačić et al., 2013) polisacárido constituido por glucosa y sacarosa; donde, es posible que la flora microbiana varíe de un grano a otro, aunque siempre se encuentran levaduras y bacterias lácticas. La composición de los granos del Kéfir es aún polémica ya que esta dependerá de su origen y de la elección de los métodos para la identificación microbiana. Más de 23 diferentes especies de levaduras han sido identificadas en los granos de diferentes orígenes; en donde entre las especies predominantes se tienen *Candida Kéfir*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces delbrueckii* y *Saccharomyces exigus* y *Kluyveromyces marxianus* ssp. *Marxianus* (Diosma et al., 2013) también se encuentran bacterias heterofermentativas como *Lactobacillus Kéfir* y en ocasiones *Lactobacillus cacea*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter* (Witthuhn et al., 2005; Assadi et al., 2000). El balance de la población de todos estos microorganismos determina la actividad de los metabolitos biológicamente activos que son esenciales para el crecimiento de los granos y la inhibición de microorganismos externos como patógenos o contaminantes.

La actividad de los granos dependerá de la viabilidad de la microbiota, donde generalmente se encuentran presentes cerca de 10^8 UFC/g de bacterias ácido lácticas, 10^6 - 10^7 UFC/g de levaduras y 10^5 UFC/g de bacterias de ácido acético (Garrote et al., 2001; Witthuhn et al., 2005). La distribución de los microorganismos en la matriz de la microbiota de Kéfir fue estudiada por Bottazzi (1980) en donde afirma que la población de las levaduras y lactobacilos no se encuentran aleatoriamente distribuidas en el grano y mediante, el uso de un microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscope) observaron a los lactobacilos en la periferia del grano, mientras que las levaduras se encontraban dentro (Figura 1.3).

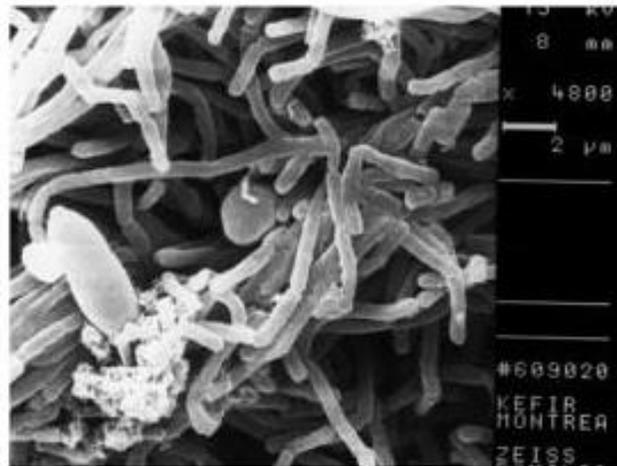


Figura 1.3 Micrografía electrónica del grano de Kéfir (Glenn, 2006)

1.3.1.2 Formación de los granos de Kéfir

Los granos de Kéfir no pueden ser formados en un laboratorio o en la industria al combinar cultivos puros de los microorganismos que lo conforman, ya que estos granos solo pueden reproducirse de granos preexistentes (Singh & Shah, 2017). Y aunque en el mercado existen cultivos liofilizados que imitan al Kéfir tradicional una de sus principales desventajas es que estos cultivos liofilizados es que no producen un Kéfir original (Pogačić et al., 2013; Brooker & Marshall, 1984). Estos granos de Kéfir tuvieron su origen cuando se imitó el proceso tradicional de fermentación en bolsas hechas de pieles de animales como cabras u ovejas y fueron transmitidos de generación en generación (Bourrie et al., 2016; Nielsen et al., 2014).

1.3.1.3 Propagación del cultivo iniciador del Kéfir

Los granos de Kéfir son el cultivo iniciador que se utiliza repetidamente; el cual, permanece activo indefinidamente (Rattray & O'Connell, 2011). La biomasa de los granos del Kéfir incrementa en cantidad y tamaño durante el proceso de fermentación de la leche, los granos son generalmente recuperados de la leche fermentada para ser reusados. La actividad de los granos dependerá de la viabilidad de la microbiota, donde generalmente cerca de 10^8 CFU/g de bacterias del ácido láctico, 10^6 - 10^7 CFU/g de levaduras y 10^5 CFU/g de bacterias de ácido acético se encuentran presentes en los granos de Kéfir (Garrote et al., 2001).

1.3.2 Producción de Kéfir

Aunque la leche de vaca es uno de los sustratos más comunes para la elaboración de Kéfir; este puede ser producido también con leche de ovejas, cabras, camellos y búfalos (Rosa et al., 2017; Arslan, 2015; Nielsen et al., 2014) así como de suero y otras fuentes no lácteas incluyendo sustitutos de leche como la leche de soya, arroz, coco entre otros (Magalhães et al., 2011; Magalhães et al., 2010). La primera producción ocurre a nivel artesanal y este tipo de práctica ha llegado a ser algo común en el mundo. Al final de la fermentación, se separan los granos de la bebida y se utilizan para producir un lote nuevo, donde el Kéfir de mejor calidad se obtiene asegurando una fermentación equilibrada, logrando la sucesión microbiana a la leche fermentada (Walsh et al., 2016).

1.3.2.1 Métodos de producción de Kéfir

Existen diferentes métodos para la producción de Kéfir; de los que se pueden resaltar I) el método tradicional y II) el método ruso (Singh & Shah, 2017). En las prácticas tradicionales la leche pasteurizada es inoculada con granos de Kéfir o mediante un cultivo iniciador de tipo industrial (Pogačić *et al.*, 2013; Otles & Cagindi, 2003). A diferencia de las prácticas tradicionales, el término de tipo industrial en la fabricación de Kéfir, significa el uso de cultivos comerciales que contienen cepas aisladas de varias especies de bacterias ácido láctico y/o levaduras. A diferencia del Kéfir elaborado a partir de granos de Kéfir, el Kéfir fabricado con un cultivo de este tipo, carece significativamente de su autenticidad como Kéfir (Wszolek *et al.*, 2007).

I) Método tradicional

La producción a través del método tradicional es practicada en muchos países, esta producción se lleva a cabo mediante la adición entre un 2-10% de granos de Kéfir directamente a la leche pasteurizada a una temperatura entre 20 y 25°C por un periodo de fermentación de 24 h; una vez pasado este periodo; los granos son retirados mediante un filtrado, quedando la bebida lista para el consumo (Garrote *et al.*, 1998). En este tipo de producción la temperatura y tiempo de fermentación no se encuentran estrictamente controlados y se puede elegir retirar los granos hasta un pH determinado o hasta obtener el sabor y textura deseada. Los granos retirados son utilizados para nuevas fermentaciones.

II) Método Industrial

La producción industrial basada en el método ruso o europeo, consiste en dos fermentaciones y es usada para la producción de Kéfir a gran escala. Este proceso inicia con la preparación del cultivo iniciador al ser inoculada con granos de Kéfir la leche en un 2-10% (p/v) a una temperatura de 20-25°C durante 18-24 h, seguida por la separación de granos por filtración. Estos granos son retenidos para ser reusados mientras que el producto de la filtración es inoculado en un lote fresco de leche pasteurizada al 2-7% (p/v), seguida por una fermentación a 19-25°C entre 12-18 h, posterior a ello, el producto se enfría lentamente y luego se mantiene a 8-10°C durante 8-12 h (Kesenkaş, *et al.*, 2017; Nielsen *et al.*, 2014; Rattray & O'Connell, 2011). Durante esta etapa de enfriamiento, se produce la segunda etapa de la fermentación, que comprende una fermentación alcohólica y la producción de CO₂ y desarrollo del sabor (Rosa *et al.*, 2017; Rattray & O'Connell, 2011).

1.3.3 Beneficios del Kéfir

En el caso del Kéfir, adicional a los beneficios ya mencionados; este ofrece una gama de beneficios para la salud (Otlés, 2003) de los que se pueden resaltar el efecto antimicrobiano y antioxidante, favorecer la tolerancia a la lactosa, disminuir la hipocolesterolemia (Rosa *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2006; Hertzler & Clancy, 2003; Liu *et al.*, 2002) además; de contener minerales y aminoácidos esenciales que ayudan al organismo en sus procesos de curación, las proteínas de esta bebida están ya parcialmente digeridas por lo que pueden ser más fácilmente utilizadas por el organismo, el triptófano presente en abundancia en el Kéfir se convierte en serotonina que brinda efectos relajantes en el sistema nervioso. Es fuente de vitamina B1, B2, B5 y C dicho contenido estará influenciado tanto por el tipo de leche

utilizado y la calidad del inóculo (Sarkar, 2007) ofrece también; fósforo, calcio y magnesio los cuales son primordiales para el desarrollo locomotor del hombre (Lau, 2010).

1.4 Fermentación

En los métodos de producción de Kéfir (1.3.2) se hace referencia al proceso de fermentación, la cual es uno de los métodos más antiguos y económicos de preparación de alimentos en el mundo (Plessas et al., 2011) y se define como un proceso en el que el crecimiento y las actividades metabólicas de los microorganismos son empleadas para preservar alimentos, en el caso específico del Kéfir es un proceso donde el producto sufrirá una transformación mediante una doble fermentación (ácido-alcohólica) que es donde la bebida adquirirá las propiedades organolépticas y nutricionales que le caracterizan.

1.5 Proceso de secado

El secado es definido como “la aplicación de calor bajo condiciones controladas para remover la mayor cantidad de agua presente normalmente en el alimento por evaporación o en el caso de la liofilización por sublimación” (Fellows, 2000). Esta técnica ha sido de vital importancia utilizada por el hombre desde los inicios de la humanidad. En el principio el hombre era cazador y recolector por lo que; debía consumir los alimentos, prácticamente de manera inmediata y, a medida que fue descubriendo algunas técnicas primitivas de conservación de alimentos como el ahumado, la cocción al fuego y el secado al sol, le fue posible conservar alimentos por más tiempo (Ahmed et al. , 2013).

En las últimas décadas en la industria de alimentos, se han realizado esfuerzos considerables para entender algunos de los cambios químicos y bioquímicos que ocurren durante este proceso y desarrollar técnicas y equipos que permitan prevenir pérdidas en la calidad del alimento, pues las propiedades de los alimentos se ven altamente afectados, influyendo significativamente en su alcance de aplicación y valor comercial (Dehnad *et al.*, 2016). Y aunque, el secado de los alimentos ha ido evolucionando al paso del tiempo; su objetivo principal sigue siendo el mismo, reducir o eliminar la cantidad de agua presente en el alimento para minimizar las reacciones microbiológicas, químicas y bioquímicas que implican un deterioro e incrementar su vida de anaquel (Jangam, 2011). Además de

mantener la estabilidad del producto, se reduce significativamente el peso y volumen del producto, disminuyendo a su vez los costos de almacenamiento y distribución.

Sin embargo, es importante considerar que cualquier alimento o producto al ser sometido a cualquier proceso de secado este, se verá afectado en sus características físicas, químicas y biológicas que afectarán sus características tradicionales y valor nutrimental; en el caso del secado de cultivos bacterianos, enzimas o vitaminas, se necesita una inactivación mínima del microorganismo y la enzima. Por lo tanto, los efectos perjudiciales de secado pueden ser deseable o indeseables, dependiendo del propósito del proceso de secado (Durance, 2002).

1.5.1 Secado por liofilización

La liofilización es hoy en día, el mejor y más popular método de secado; utilizado por décadas (Duan et al., 2016) debido a sus resultados en términos de viabilidad y largo periodo de almacenamiento (Nakagawa & Ochiai, 2015; Vesterlund et al., 2012; Morgan et al., 2006; Miyamoto-Shinohara et al., 2000) y ha llegado a ser, uno de los métodos más importantes en la preservación de materiales biológicos sensibles al calor (Sadikoglu et al., 2006). Fue concebida a principios del siglo XX aunque, no fue difundida hasta pasada la segunda guerra mundial inicialmente en el campo de la sanidad, para ser aplicada como proceso industrial en la década de 1950 y al sector alimentario en 1958; aunque, sus principios eran conocidos y también empleados por los incas que dejaban que los alimentos se congelarían por la acción del frío de los andes por la noche y a la mañana siguiente con los primeros rayos del sol y a la baja presión atmosférica de los andes se producía la sublimación del agua que se había congelado, proceso conocido como liofilización natural. La liofilización es un proceso de secado para productos que se requiere conservar su sabor, bioactividad y otras propiedades que le caracterizan (Boss et al., 2004). Dentro de sus aplicaciones y ventajas se encuentra el secado de material biológico y productos farmacéuticos, como proteínas, vacunas, bacterias, células de mamíferos y alimentos de alta calidad. Se sabe que preserva la calidad del producto incluyendo sus propiedades nutricionales y organolépticas. congelando el material y promoviendo la transición del disolvente, generalmente agua, de la fase sólida a la fase gaseosa por sublimación (Ahmed et al., 2013; Liu et al., 2008; Morgan et al., 2006). La liofilización se lleva a cabo por debajo del punto triple del disolvente (agua) para evitar con esto, el paso por la fase líquida (Figura

1.4). Este punto triple es aquel, donde el agua líquida, agua sólida y agua vapor se encuentran en equilibrio, este punto se produce a 0.006 atm (4.56 mm de Hg) de presión y a 0.16°C (Nireesha et al., 2013).

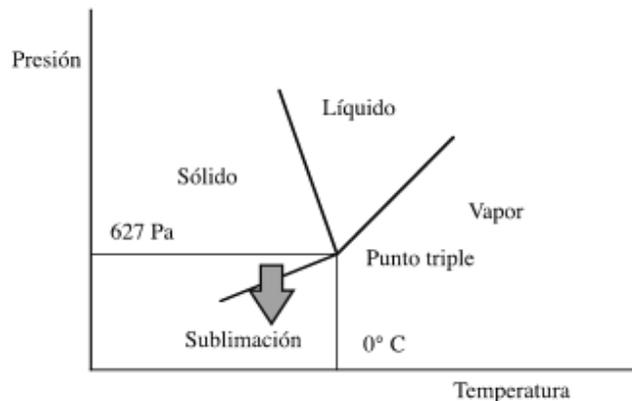


Figura 1.4 Diagrama de las fases del agua (Tejeda, 2018)

Las condiciones en que se lleva a cabo la liofilización permiten mantener casi intactas las propiedades fisicoquímicas del alimento, inhibiendo el crecimiento bacteriano. Por lo que; para lograr una liofilización de calidad, se debe realizar una congelación muy rápida con el objetivo de obtener cristales de hielo pequeños y amorfos, evitando la formación de cristales de gran tamaño que puedan dañar las calidades estructurales de los tejidos y, por lo tanto, la textura del producto, la etapa de secado se lleva a cabo a presiones bajas para permitir la sublimación del hielo (Barbosa-Canovas et al., 2014).

1.5.1.1 Etapas del secado por liofilización

El secado por liofilización combina en tres fases la congelación y el secado (Orrego Alzate, 2008) (Figura 1.5): 1) congelación del alimento, 2) secado primario y 3) sublimación.

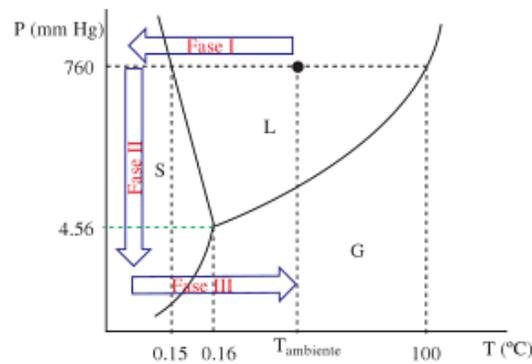


Figura 1.5 Fases de la liofilización (Orrego, 2017)

1. Congelación, es esta etapa el objetivo es congelar el disolvente (comúnmente agua) del alimento a bajas temperaturas, en esta primera etapa la congelación se lleva rápidamente produciendo pequeños cristales de hielo, reduciendo el daño a la estructura celular del alimento (Velardi & Barresi, 2008; Schoug et al., 2006).
2. Secado primario, es la etapa en donde el hielo es sublimado a presiones por abajo del punto triple del agua. A medida que el hielo se sublima, en el alimento se forma una capa porosa de material seco. La sublimación es el cambio del estado sólido directo al estado gaseoso sin pasar por la fase líquida (Duan *et al.*, 2016; Wales et al., 2009).
3. Secado secundario, es la etapa final del proceso de liofilización, llamada desorción que inicia al final de la sublimación e implica la eliminación adicional de agua que no eliminó en el secado primario (Se estima un remanente entre 5 y 10%) teniendo un rol significativo en el contenido de humedad deseada para el producto final, garantizando la conservación del producto a largo plazo (Velardi & Barresi, 2008a; Morgan & Vesey, 2009).

1.5.2 Secado por aspersion

El secado por aspersion es una operación unitaria, que consiste en convertir líquidos en sólidos, atomizándolos en una corriente de gas en un solo paso, produciendo partículas secas de polvo esférico con buena fluidez, alta tasa de eliminación de humedad y tamaño de partícula uniforme (Sosnik & Seremeta, 2015; González et al., 2015). El líquido inicial alimentado al aspersor puede ser una solución, emulsión o suspensión y dependiendo del tipo de material alimentado y de las condiciones de secado será el polvo final obtenido. El secado por aspersion es un método rápido, rentable y eficiente, que puede utilizarse para

producir grandes cantidades de productos. Es una técnica, que produce partículas secas de polvo esférico con buena fluidez, alta tasa de eliminación de humedad y tamaño de partícula uniforme (Sosnik & Seremeta, 2015). Tiene una amplia aplicación en las industrias de alimentos, farmacéutica, química y nanotecnológica (Wisniewski, 2015).

Este tipo de secado es una alternativa para la obtención de productos probióticos deshidratados debido al alto grado de supervivencia de los microorganismos presentes, requisito principal para mantener la viabilidad durante el almacenamiento, transporte y uso en alimentos funcionales (Papapostolou et al., 2008; Luna-Solano et al., 2005; Gardiner et al., 2002). En la Figura 1.6 se muestra las partes que conforman un secador por aspersión.

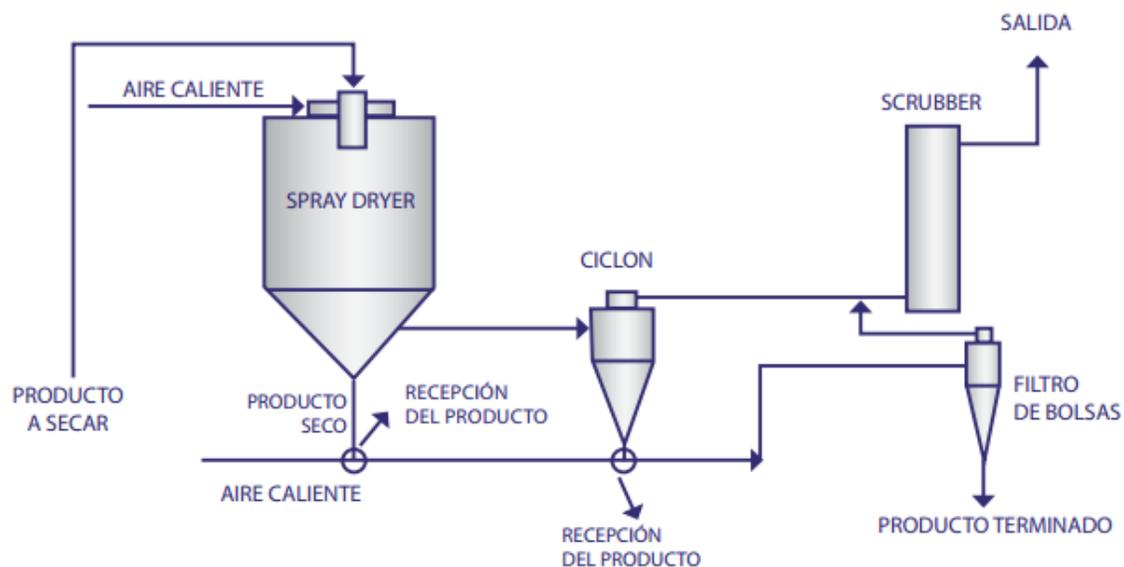


Figura 1.6 Partes que conforman un secador por aspersión (Fuente: CIMA INDUSTRIES INC.)

1.5.2.1 Etapas del secado por aspersión

Durante el secado por aspersión se pueden distinguir las siguientes etapas (González et al., 2015; Sosnik & Seremeta, 2015): 1) Atomización, 2) Contacto de gota-aire caliente 3) Evaporación de agua y 4) Separación de producto seco y aire húmedo.

1. La atomización es la primera etapa en donde el fluido es alimento a la cámara de secado por una bomba peristáltica a través de un atomizador o boquilla, el fluido es reducido en un fino spray al descomponerse en una gran cantidad de pequeñas gotas. La fuerza propulsora que ayuda a llevar a cabo la atomización incluye presión, centrifuga, electrostática y de ultrasonido, típicamente instalada en la boquilla atomizadora. El

objetivo de la atomización es crear la máxima superficie de transferencia de masa y calor. Donde la elección de la configuración y tipo de atomizador dependerá de la naturaleza y viscosidad de la alimentación y características deseadas del producto seco (Heng *et al.*, 2011).

2. Contacto de gota-aire caliente. Después de la atomización, las gotas experimentan la conversión en la forma de partículas secas mientras pasan a través de aire caliente dentro de la cámara de secado, la distancia que recorre la gota atomizada hasta el contacto con el aire caliente dependerá del tamaño de la gota, su forma y densidad (Heng *et al.*, 2011; Mujumdar, 2006).
3. Evaporación de agua. El intercambio de calor y masa inicia después de que las gotas son liberadas del atomizador y viajan con el aire caliente. La gota empieza a perder agua en forma de vapor y da inicio a la formación de una partícula dando como resultado al final del secado por aspersión una partícula sólida y completamente definida (González *et al.*, 2015).
4. Separación de producto seco y aire húmedo. Después del secado, las partículas se separan del aire húmedo, el cual se descarga del secador después de separarlas de las partículas ya secas. Esta separación se realiza mediante un ciclón ubicado fuera de la cámara de secado, lo que evita la pérdida de producto a la atmosfera. Las partículas de mayor densidad son recuperadas en la base de la cámara de secado, mientras que las partículas más finas pasan a través del ciclón para ser separadas del aire húmedo. Y debido a que, el gas arrastra algo de polvo, se utilizan filtros para remover el polvo restante (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

1.6 Encapsulación

La encapsulación tiene sus inicios de acuerdo Yáñez *et al.* (2002) a entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de gelatina como agente encapsulante y se empieza a desarrollar en los años 50 con la investigación de recubrimientos sensible a la presión. En el área de alimentos, es común, que se adicionen ingredientes por distintas razones por ejemplo antimicrobiano, estos ingredientes se adicionan, en un esfuerzo para evitar la proliferación de microorganismos y alargar la vida de anaquel del alimento que contienen lípidos mediante la protección de triacilglicerol y fosfolípidos contra la degradación oxidativa y dada la necesidad de

proteger materiales encapsulados de factores externos como calor, luz y humedad, con la finalidad de mantener su estabilidad y en algunos casos viabilidad (S. Huang et al., 2017).

La encapsulación es un término conocido también como microencapsulación técnica en la cual, un material o mezcla de material es cubierto o atrapado por otro material con la finalidad de formar una barrera entre el material activo y su entorno para protegerlo de condiciones específicas que pudieran deteriorarlo. La sustancia que es encapsulada puede ser llamada material núcleo, agente activo, fase interna entre otros y la sustancia encargada de encapsular es conocida como material de soporte, material de pared o matriz (Zuidam & Shimoni, 2010) debiendo ser, de grado alimenticio con la capacidad de formar una barrera entre la sustancia activa y su entorno y protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir reacciones de oxidación (Montes et al., 2007). Y en el caso de alimentos que involucren microorganismos el material de pared o encapsulante evitara un daño en la estructura de la pared celular, ya que su función es mantener a los microorganismos en una matriz protectora (Jiménez et al., 2015), permitiendo la supervivencia de estos en el alimento (Bielecka & Majkowska, 2000).

Existen muchas técnicas para encapsular, sin embargo, el secado por aspersión es el método más comúnmente utilizado, eficiente y rentable (Nale et al., 2018). Uno de las primeras fases para la encapsulación de alimentos es la adecuada selección de material de pared. Entre los materiales más comunes utilizados para el encapsulamiento se encuentran: gelatinas, grasas, aceites, goma arábica, alginato de calcio, ceras, almidón de trigo, maíz, arroz, papa, maltodextrina, caseinato de sodio, proteína de suero entre otros, el proceso de transformación afectará también biológicamente al alimento (Parra, 2010).

Entre los usos de algunos de estos materiales de pared, se puede mencionar que la maltodextrina se utiliza en la encapsulación de bioactivos, protegiéndolos fisicoquímicamente de los cambios por oxidación y temperatura además que es considerada un buen material de pared debido a sus características de baja viscosidad, alto contenido de sólidos y costo accesible, este material de pared también ha demostrado ser un muy buen encapsulante para azúcares de bajo peso molecular como la fructosa y los ácidos orgánicos; también se ha reportado que, con la adición de este material de pared han mejorado las condiciones del secado por aspersión; en el caso de la goma arábica es

un polisacárido que también tiene propiedades de barrera utilizado ampliamente para el secado por aspersión (Quek et al., 2007; Adhikari et al., 2004; Adhikari et al., 2003).

1.7 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas en los alimentos deshidratados

Los componentes que constituyen los alimentos se encuentran en continua interacción entre ellos y con el ambiente externo que los rodea, esta interacción les otorga propiedades y características específicas que de alguna u otra forma afectarán la calidad del alimento a lo largo del tiempo; por tal razón, es de suma importancia conocer dichas propiedades y su influencia reciproca para aplicar el proceso de conservación y transformación más idóneo, que permita conservar en el alimento, las propiedades que le caracterizan.

1.7.1 Humedad

El contenido de humedad en los alimentos es un factor importante que afectara su estabilidad debido a las reacciones químicas y enzimáticas que se llevan a cabo lentamente durante el almacenamiento del producto (Fellows, 2000). La humedad indica la cantidad de agua presente en una muestra y su determinación es una medida analítica importante en la investigación, fabricación y control de calidad de los alimentos (Pu et al., 2016; Tapia et al., 2008) cuando este valor se reduce por debajo del 10% los microorganismos son inactivados. La humedad del alimento es usualmente calculada en base seca, como la cantidad de agua en la muestra y la cantidad de solido contenido, este valor puede expresarse en dos maneras 1) porcentaje como contenido de humedad en base seca o 2) porcentaje como contenido de humedad en base humedad. La primera se puede definir matemáticamente por la Ecuación 1.1. (Norbrillinda et al., 2016; Martines & Lira, 2010) y la segunda que es el contenido de humedad en base seca se encuentra expresada por la Ecuación 1.2.

$$\%X_{wb} = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100 \quad 1.1$$

Donde W_i es el peso inicial de la muestra antes del secado, W_f es el peso final de la muestra después del secado.

$$\%X_{db} = \frac{W_{H_2O}}{W_d} * 100 \quad 1.2$$

Donde W_{H_2O} es el peso del agua en el alimento y W_d es el peso de la muestra seca.

1.7.2 Actividad de agua (a_w)

El agua en muchas situaciones, no se le considera un nutrimento al no surtir cambios químicos durante su aprovechamiento biológico; sin embargo, de acuerdo a Badui (2006) es innegable que sin ella no podrían llevarse a cabo, todas las reacciones bioquímicas de las células activas. El agua se divide en “libre” y en “ligada”, la primera es el agua disponible para el crecimiento de microorganismos, la segunda es el agua unida a la superficie sólida y no actúa por no estar disponible. Es decir que solo una pequeña cantidad de agua, llamada “actividad de agua (a_w)” es la que tiene movilidad y es capaz de propiciar cambios en un producto. La actividad de agua es una propiedad intrínseca relacionada de manera no lineal con el contenido de humedad mediante isotermas de adsorción y desorción.

La actividad de agua es considerada como un parámetro de estudio en la química de los alimentos (Sahin & Sumnu, 2007; Placido & Aleman, 2002) y se define como la humedad en equilibrio de un producto, determinada por la presión parcial de vapor de agua de una sustancia y la presión de vapor de agua del agua pura a la misma temperatura siendo una medida adimensional y con valor entre 0 y 1. Los microorganismos crecen en determinados valores por ejemplo las levaduras osmófilas y algunos mohos pueden crecer en valores de actividad de agua de 0.6 a 0.65; por lo que, la reducción de la actividad de agua por debajo de estos valores permiten obtener un producto estable microbiológicamente, autores como (Perussello et al., 2013) afirman que, la actividad del agua (a_w) de un alimento debe disminuir hasta aproximadamente 0.3 para evitar las reacciones de degradación microbiológica y enzimática.

Cuando la actividad de agua (a_w), se encuentra en equilibrio, se dice que esta actividad de agua es igual a la presión de vapor ejercida por la sustancia en un ambiente controlado (Sanez, 2012). Donde se da una correspondencia entre la humedad relativa del aire en el ambiente controlado y la actividad de agua en la sustancia sujeta de estudio y su expresión matemática está dada por las Ecuaciones 1.3. y 1.4.

$$a_w = \frac{\% HR}{100} \quad 1.3$$

$$a_w = \frac{P}{P_o} \quad 1.4$$

Donde P es la presión de vapor del agua del alimento a una temperatura T, P_o es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura y las mismas unidades que P, y el % HR es la humedad relativa de equilibrio del alimento, a la cual no se gana ni se pierde agua (Shirley, 2016).

1.7.3 Color

La apariencia de los alimentos generalmente son uno de los atributos de calidad sensorial más importante de los alimentos frescos y procesados apreciadas por el consumidor los cuales se ven atraídos por aquellos productos de apariencia atractiva, otras sensaciones como el olfato, el gusto y la textura contribuyen a la calidad de estos productos. Sin embargo, en muchos casos el color del alimento es el primer criterio que percibe el consumidor y su reconocimiento y aceptación en el mercado depende en gran medida del color característico mediante el cual es identificado (Badui, 2006). Así, en la industria alimentaria, la evaluación del color de los alimentos y de sus componentes se ha convertido en una parte integral del control de calidad total ya que este, está sujeto a cambios durante el procesamiento (Pathare et al., 2012; Kneifel et al., 1992). Por otra parte, el color también puede proporcionar información sobre la calidad comestible o intensidad de sabor del alimento.

El color es afectado por muchos factores, tales como la iluminación, el observador, el espectro, la presencia de pigmentos o de las propias características de la superficie del alimento, tamaño, textura y brillo que pueden enmascarar el color real. En el caso de los alimentos sometidos a un proceso de secado, el color puede cambiar debido a una serie de reacciones químicas y bioquímicas. Este color observado por el ser humano es la percepción de las longitudes de onda que vienen de la superficie del objeto en la retina de los ojos, con una sensibilidad a longitudes de onda entre 400 y 700 nm con una sensibilidad

óptima a la luz de 50 nm. A partir de las características espectrales de la superficie de un objeto, el color puede expresarse en variables que se corresponden con la percepción del color del ser humano.

Uno de los métodos para evaluar el color es el sistema desarrollado por Richard Hunter en 1952, el cual define la gama de colores en términos de parámetros adimensionales llamados L , a , b , tomando como base la teoría de los colores opuestos de Hering (Figura 1.7) en la cual se establecen coordenadas triestimulo dentro de un plano cartesiano (Figura 1.8), donde L , corresponde a la luminosidad, a y b a la cromaticidad; el parámetro a define el componente rojo-verde: rojo para valores positivos y verde para valores negativos y el parámetro b define el componente amarillo azul: amarillo para valores positivos y azul para valores negativos.

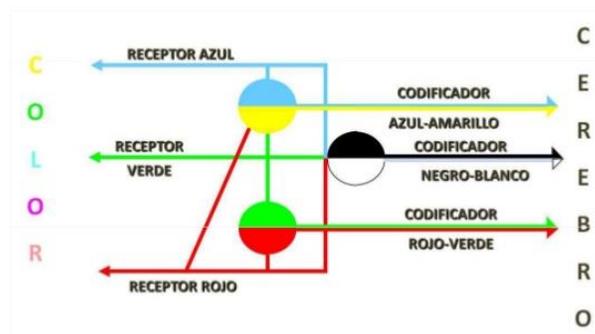


Figura 1.7 Teoría de los colores opuestos (Hunter Lab. 2012)

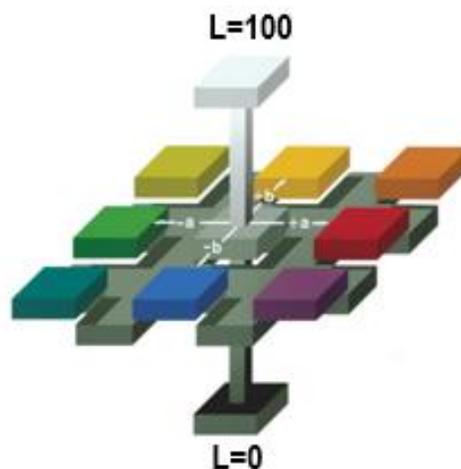


Figura 1.8 Diagrama Hunter L , a y b (Hunter Lab)

1.7.4 % de acidez y pH

Los productos lácteos fermentados se caracterizan por su sabor ácido, originado por la presencia en su composición de ácido láctico, un subproducto de la fermentación láctica que se lleva a cabo para su elaboración y que involucra el crecimiento y actividad de microorganismos responsables de los cambios en el producto. La acidez titulable y el valor de pH son medidas utilizadas generalmente como medidas de acidez para determinar la calidad de productos lácteos antes y después del proceso de fermentación (Affane et al., 2011) y aunque no existe una relación directa entre el valor de pH y el valor de acidez, si existe una regla general, la cual dice que el pH disminuye a medida que aumente el valor de la acidez (Walstra et al., 2005) y que el contenido de acidez es una referencia más cercana en el sabor ácido del alimento que el pH (Sadler & Murphy, 2010).

En el caso del Kéfir el % de acidez es un parámetro importante durante todo el proceso de producción ya que se ha demostrado que una acidez insuficiente o excesiva influirá en sus propiedades y a la vez alterará la estructura del polvo al ser sometido al secado por aspersión (Chandan & Kilara, 2013). Los valores promedio de ácido láctico se encuentran reportados en la literatura entre 0.6 y 1.0 % reportado como ácido láctico (Singh & Shah, 2017; Kesenkaş et al., 2017; Sarkar, 2007; Garibay et al., 2004) Y, 1.07 ± 0.06 en microcápsulas de Kéfir secadas por aspersión sin encapsulantes (García et al., 2006)

1.7.5 Bacterias ácido-lácticas y levaduras

La tasa de supervivencia de los microorganismos después de ser sometido a un proceso de secado requiere condiciones de estabilización adecuados para evitar daños bacterianos o la muerte (Quintana et al., 2017) ya que, el contenido de microorganismos probióticos es uno de los factores más importantes en el producto final para ser considerado en primera instancia como probiótico. La tasa de supervivencia de los microorganismos es fácil de perder debido al estrés al que están sometidas las bacterias durante el proceso de secado. Un alimento funcional clasificado dentro de los alimentos probióticos deberá contener al menos 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) (7 unidades logarítmicas de UFC/g) de alimento (Madureira et al., 2011; Araya et al., 2002), se han sugerido recuentos $> 8 \log$ UFC/g para asegurar los efectos probióticos (Vinderola & Reinheimer, 2000; Shah et al., 1995; Samona & Robinson, 1991)

1.8 Almacenamiento

Uno de los mayores retos de la industria de los alimentos es la conservación de los mismos, donde el envase o empaque utilizado en el almacenamiento de un producto tiene una gran importancia, y es claramente una parte integral del proceso de fabricación y distribución. El objetivo del empaque es contener los alimentos, mantener la seguridad ya que forma una barrera entre el medio externo, limita los costos y minimiza el impacto al medio ambiente. Por lo que, un empaque adecuado puede retrasar o alargar la vida útil del producto (Marsh & Bugusu, 2007). Donde la vida útil puede definirse como el período durante el cual el alimento conserva un nivel aceptable de calidad alimentaria desde el punto de vista de la seguridad y organoléptico (Man & Jones, 2000).

De la misma forma deben considerarse las condiciones de almacenamiento y establecer criterios que eviten afectar las tasas de rección y el crecimiento de microorganismos; ya que estas condiciones, deben facilitar la disminución del deterioro y proporcionar estabilidad que aseguren una vida de anaquel apropiada (Costa et al., 2016). Estudios realizados revelan que en el empaque al vacío el oxígeno es reducido a valores por debajo del 1% retrasando el crecimiento de mohos y levaduras, además que estas condiciones preservan la calidad sensorial en los alimentos, reduciendo además la incidencia del daño oxidativo (Smith et al., 2004). Por otra parte la técnica de atmosfera modificada es una técnica que tiene como objetivo modificar el microambiente del producto almacenado y se fundamenta en la variación del contenido de oxígeno, anhídrido carbónico o nitrógeno en las cámaras de almacenamiento (Lanchero et al., 2007)

En relación a los alimentos deshidratados probióticos, existen factores principales como la a_w la temperatura de almacenamiento, el contenido de oxígeno y la humedad relativa que influyen en la viabilidad de los probióticos durante el almacenamiento (Jiménez et al., 2015) (Farnworth & Champagne, 2010). Como regla general, los cultivos incluso secos, deben mantenerse refrigerados. En los procesos tradicionales de liofilización, de acuerdo a Champagne et al. (1996) el aumento de la temperatura de almacenamiento de 4 a 25 °C resulta en una reducción de diez veces la estabilidad. Algunos productos comerciales pueden conservarse a temperatura ambiente durante unos meses y no sufren pérdidas de viabilidad. Sin embargo, se requieren condiciones de fabricación muy específicas y controladas para obtener dichos productos, ya que existen informes de productos

almacenados de manera incorrecta que no tienen el contenido de microorganismos especificados.

1.8.1 Empaque al vacío

El empaque al vacío, ha sido utilizado en la industria láctea desde hace mucho tiempo y ha sido aceptado por los consumidores (Sánchez-Rivera et al., 2013). Este proceso consiste en colocar el producto en una bolsa, extraer el aire que se encuentra dentro del empaque y sellar la bolsa; un buen sistema de empaque al vacío permite reducir el nivel de oxígeno hasta el 1%.

1.8.2 Empaque en atmósfera modificada

El envasado en atmosfera modificada (MAP) puede ser definido como un método de envasado activo en el que la atmosfera, es alterada al ser sustituido el espacio libre dentro del empaque por un gas o mezcla de gases a fin de reducir el grado de respiración retrasar el deterioro enzimático y, al mismo tiempo disminuir el crecimiento microbiano y, por lo tanto, retrasar el crecimiento de los organismos de descomposición y alargar la vida útil del producto (Ospina Meneses & Cartagena Valenzuela, 2008). Existen tres subcategorías en los empaques con atmosferas modificadas: empaques MAP con alto contenido de oxígeno, MAP con bajo contenido de oxígeno y empaques con atmosfera controlada (Parry, 2012; Zakrys-Waliwander et al., 2012). Los gases comúnmente utilizados para MAP incluyen dióxido de carbono (CO₂), O₂ y nitrógeno (N₂). El gas más importante en términos de base microbiológica es el CO₂, utilizado solo o en mezclas con N₂ y/o O₂, que inhibe el crecimiento de muchos microorganismos, incluidas las bacterias del deterioro. CO₂ tiene un efecto bacteriostático y fungistático, mientras que el N₂ evita la oxidación de los compuestos lipídicos del producto preservando su calidad fisicoquímica y sensorial (Juric et al., 2003). Otros gases empleados en los MAP, aunque en menor proporción son el monóxido de carbono, dióxido de sulfuro, etanol y argón (Temiz, 2010; Ospina & Cartagena, 2008).

1.9 Estudios realizados

El proceso de secado por liofilización ha sido estudiado por diversos investigadores, entre estos estudios se encuentran los realizados por Atalar & Dervisoglu (2015) que emplearon la metodología de superficie de respuesta para optimizar las condiciones del proceso de

secado por aspersión para la producción del Kéfir en polvo. Evaluando la temperatura del aire de entrada (120 a 180°C), la temperatura de alimentación (4-30°C) y la velocidad de la bomba (20 – 40%) en donde determinaron que la temperatura de alimentación no presenta un efecto significativo y que las condiciones óptimas se encontraron a una temperatura de 135 °C en el aire de entrada y la velocidad de la bomba de 35%. Al final de este estudio, las condiciones óptimas de secado por aspersión fueron comparadas con los resultados de liofilización. Los resultados mostraron que en el punto óptimo se puede obtener un polvo de calidad similar al polvo obtenido por liofilización.

Papavasiliou *et al.* (2008) realizaron la liofilización del Kéfir a partir del suero de leche como materia prima en donde examinaron los efectos de la tasa de flujo de aire y agitación en un biorreactor para la producción de la biomasa, así mismo produjeron cultivos liofilizados con varios agentes crioprotectores y diferentes velocidades de enfriamiento, por ultimo evaluaron la viabilidad del producto liofilizado en fermentaciones en donde determinaron que este producto era viable en el uso de la producción de alimentos como un cultivo iniciador

Por su parte Teijeiro *et al.* (2018) aplico el secado por aspersión para la producción de polvo de Kéfir, en donde investigaron la supervivencia de los microorganismos posterior al secado, almacenamiento y simulación de condiciones gastrointestinales. Para su deshidratación se utilizaron diversos encapsulantes como leche descremada, suero de leche y maltodextrina, obteniendo bajas tasas de supervivencia sin el uso de materiales de pared (5.5 log UFC/g de bacterias ácido lácticas y 2 log UFC/g de levaduras). En contraste, la supervivencia de los microorganismos mejoró significativamente en presencia de materiales de pared, por ejemplo, cuando se utilizó leche descremada, la supervivencia de las bacterias del ácido lácticas fue superior a 9 Log UFC/g, pero en contraste la viabilidad de la levadura se redujo considerablemente después del secado por aspersión en estas condiciones. Cuando se utilizó suero de leche como encapsulante la supervivencia de las bacterias ácido lácticas fue de 8 UFC/g y la supervivencia de la levadura fue superior a 4 UFC/g. Las bacterias ácido lácticas en las muestras deshidratadas con leche semidescremada más maltodextrina permaneció estable durante al menos 60 días a 4°C. demostrando que el secado por aspersión es un método factible para la obtención de un producto concentrado de Kéfir.

Li *et al.* (2012) utilizaron el secado por aspersion para el *Lactobacillus plantarum* MA2 aislado del Kéfir. Los resultados experimentales mostraron que las mejores condiciones de secado por pulverización fueron: temperatura del aire de entrada de 14.,9 ° C, caudal de materia prima de 61.5 ml / h, y una relación de protección: célula de 3: 1. Las células viables de los cultivos iniciadores secados por pulverización fueron 1.82×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC)/g.

En cuanto al almacenamiento de la microbiota o granos de Kéfir, Kök Taş (2015) liofilizo granos de Kéfir sin el uso de crioprotectores; para posteriormente almacenarlos en una película plástica multicapa con barrera de humedad; que permitiera, la conservación adecuada del producto manteniendo al mismo tiempo su calidad microbiana a lo largo de su vida útil y diferentes temperaturas de almacenamiento todo ello durante un periodo de 90 días. Al término del estudio se determinó que la actividad microbiana continuo hasta el día 60 de almacenamiento a una temperatura de almacenamiento de 4°C, y aunque no se utilizaron crioprotectores en este estudio, la estructura de polisacáridos protegió la microbiota del grano de kéfir. Esta estructura de polisacárido es un protector natural, ya que nuestros resultados demostraron que la microbiota de grano de kéfir sobrevivió durante el proceso y el almacenamiento.

Por su parte Nale *et al.* (2017) estudiaron la viabilidad de los microorganismos probióticos, las propiedades fisicoquímicas y sensoriales de microcápsulas de Kéfir preparadas con maltodextrina y goma arábica. Optimizando la microencapsulación de Kéfir con la metodología de superficie de respuesta de Box-Behnken, analizando el rendimiento del producto, el contenido de humedad, la actividad de agua, la densidad aparente, acidez valorable entre otras propiedades. Los resultados después del secado en términos de viabilidad de microorganismos se encontraron en rangos de bacterias ácido lácticas de 9.03 a 11.51 Log CFU/g y 3.09-5.90 Log CFU/g, de levaduras. La evaluación sensorial indicó que las muestras reconstituidas obtenidas a partir de muestras de kéfir microencapsuladas tenían mejores puntuaciones en cuanto a sabor, apariencia/color y estructura/textura. Por lo que al término del estudio se llegó a la conclusión que el uso de encapsulantes permitió una mejor estabilidad del producto, brindándoles propiedades instantáneas que permiten su uso en diversas formas.

Chaux et al. (2014) evaluaron el efecto de la maltodextrina y las condiciones de operación sobre la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas, mohos y levaduras presentes en este producto en el proceso de secado por aspersión de suero de leche fermentado con granos de kéfir. Inicialmente se evaluaron las condiciones de fermentación del suero lácteo a diferentes concentraciones de inóculo de kéfir que posteriormente fue secado utilizando tres temperaturas para la entrada de aire (200, 190 y 180 °C), en todas las pruebas se utilizó 20% de maltodextrina como vehículo protector encontrando que las tres temperaturas utilizadas en el proceso, reducen en un ciclo logarítmico la población de las bacterias ácido lácticas, mohos levaduras. No obstante, su recuento en el producto en polvo alcanzó valores del orden de 10^6 y 10^7 UFC/g, indicando la viabilidad de la metodología de secado por aspersión en la obtención de este tipo de microorganismos en polvo.

Chen *et al.* (2010) optimizaron la producción de un dulce de Kéfir con alta viabilidad probiótica utilizando la metodología de superficie de respuesta y la *Programación Cuadrática Secuencial (SQP)* los resultados indicaron que el Kéfir que contiene galactosa, sacarosa y en leche descremada en polvo 4.53, 7.0 y 5.03% (w / v), respectivamente, produciendo un dulce masticable con la más alta viabilidad de los microorganismos investigados.

1.10 Diseño experimental

En la mayoría de los ámbitos de la investigación se aplican los diseños de experimentos (DOE), siendo el DOE fundamental y que debe estar siempre presente en el campo de la investigación para el desarrollo de nuevos productos, diseño de procesos y en el área de la mejora continua (Salvatore, 2014). El DOE con su correcta aplicación, permite reducir la variación de los procesos, mejorar su eficacia y capacidad (Antony, 2003). El DOE generara nuevo conocimiento acerca de un sistema o proceso y proporciona además evidencias objetivas que permiten resolver las preguntas de investigación planteadas y de esta manera esclarecer los aspectos inciertos de un proceso, siendo una herramienta poderosa para obtener condiciones óptimas a (Pontes et al., 2016; Gutiérrez & De la Vara, 2008) todo esto; a través de una serie de experimentos, en los que se inducen cambios intencionados en las variables de entrada con la finalidad de observar, identificar, analizar y determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre experimentos y en caso de que exista, cuál sería la magnitud de estas diferencias; permite también un análisis completo de

los resultados experimentales pudiéndose además obtener, para aquellos factores que tienen influencia sobre la media de la variable respuesta, el mejor nivel que la optimiza (Iltzarbe et al., 2007; Badii et al., 2007). En teoría existen diferentes tipos de DOE que permiten abordar la gama de problemas o situaciones a estudiar por lo que, es necesario tener claro los criterios que permitan elegir en base al objetivo y alcance el DOE adecuado al problema de estudio.

1.10.1 Diseños de experimentos según Taguchi

Al hablar de los diseños experimentales según Taguchi, no se puede pasar por alto hacer mención a Genichi Taguchi ingeniero y científico japonés, considerado como uno de los actores más importantes en la recuperación económica de Japón de la posguerra, el cual introdujo en la industria enseñanzas como la metodología de mejora de la calidad, enseñanzas que redujeron los costos de fabricación e incrementaron la calidad de los productos. Su filosofía está basada en tres conceptos fundamentales. El primero considera que el diseño en la fase inicial del producto es vital para lograr la calidad. Adicional a ello, afirma que la calidad del producto final incrementa cuando se reduce la variabilidad alrededor del valor nominal u objetivo. Por último, considera que los costos de la no calidad son el resultado, del actuar de toda la organización, y, en especial la función de la variabilidad en los procesos. (Hernández et al., 2015).

Según Taguchi mejorar la calidad dentro de un proceso, requiere de un gran esfuerzo ya que el desempeño depende de muchos factores. Por lo que; plantea hacerlo, mediante la reducción de la variabilidad del valor objetivo analizado. Para ello, Taguchi propone diseños experimentales especialmente contruidos, llamados “arreglos ortogonales”, al proponer el arreglo de las pruebas, la lógica es suficiente para establecer la gama infinita de posibilidades en las combinaciones de factores a través de los rangos permisibles de cada factor involucrado. Sin embargo, en la práctica resulta un número muy largo de combinaciones y entre mayores sean las influencias de las interacciones de los factores mayor será la necesidad de planear el experimento.

Gracias a que Taguchi diseña una metodología especial de diseños para experimentos factoriales, estos tienen la posibilidad de cubrir muchas aplicaciones, por lo que una ventaja de utilizar Taguchi es que el uso de estos arreglos (matrices) ayuda a determinar con un número pequeño de corridas experimentales, las influencias e interacciones de cada factor

o factores (Gutiérrez & De la Vara, 2008). Al plantear el diseño de experimentos en base a Taguchi, se consideran los factores controlables los cuales se eligen en base a arreglos ortogonales, lo que asegura la estimación independiente de los efectos de los factores (Mitra, 2011), estos diseños según Taguchi son una alternativa a los diseños factoriales clásicos, ya que se puede conocer el efecto individual de los factores de estudio; así como, el de algunas interacciones de dos factores que puedan resultar significativas (Fernández, et al., 2008).

El método de Taguchi es uno de los métodos de diseño experimental más comunes. Generalmente, el primer paso del método de diseño de Taguchi es seleccionar la función objetivo o la variable de respuesta que se va a examinar de cerca. El siguiente paso es la clasificación de los factores que influyen en la variable de respuesta. El tercer paso es determinar los niveles de los factores. El siguiente paso es probar la sensibilidad de los niveles de los factores de acuerdo con el análisis experimental de una matriz ortogonal. Taguchi utiliza la matriz ortogonal que podría dar una información completa de todos los factores que influyen en el proceso la variable de respuesta. El método de diseño de Taguchi también utiliza el menor número de pruebas en comparación con los métodos clásicos. diseño de métodos de experimentación tales como diseño factorial completo, método de superficie de respuesta, método personalizado o diseño central compuesto La finalidad es determinar los mejores niveles de los factores para lograr un nivel óptimo de respuesta (Khanna & Davim, 2015; Durán-Jiménez et al., 2014)

Para realizar la tabla de arreglos ortogonales se deberá definir previamente los niveles representativos de todos los factores a analizar, donde la combinación de cada experimento representará a todos los factores y niveles del diseño (Ji et al., 2014). La selección del arreglo ortogonal dependerá del número de factores de interés y el número de niveles que serán evaluados.

La tabla ortogonal es la base del diseño experimental y se forma de la siguiente manera:

$$L_n (m^k)$$

1.1

Donde L es el símbolo de la tabla ortogonal; n es el número de ensayos y el número de filas que corresponden directamente al número de casos de prueba; m es el mayor número de

factores dispuestos y es el número de columnas en la tabla ortogonal que corresponden directamente a los parámetros estudiados; k es el número de niveles de cada factor o parámetro.

1.10.2 Condiciones óptimas según Taguchi

Taguchi es un método de optimización de proceso-producto basado en diferentes pasos de planificación, conducción y evaluación de resultados de experimentos matriciales para determinar el mejor nivel de factores de control sobre propiedades características y por lo tanto condiciones óptimas para cualquier proceso complejo (Mosavian & Hassani, 2010) . para la optimización se utiliza un enfoque simple, eficiente y sistemático; la metodología de diseño experimental de Taguchi identifica, la condición óptima estudiando los principales efectos de cada una de las variables con respecto al objetivo de respuesta deseado como lo más pequeño es mejor", "lo más grande es mejor" o "lo nominal es lo mejor Los efectos principales indican la tendencia general de influencia de cada variable. El conocimiento de la contribución de las variables individuales es un factor clave a la hora de decidir la naturaleza del control que debe establecerse sobre una producción. (Milić et al., 2014)

En este punto es importante resaltar que la metodología Taguchi no es un método común o habitual para optimizar procesos, esto puede deberse a que los investigadores están más familiarizados con otros métodos de optimización y experimentación como superficie de respuesta y Plakette Burman (Montgomery, 2012; Huang et al., 2009; Daneshvar et al., 2007)

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Metodología general

En la Figura 2.1 se presenta la metodología general empleada para la realización de este proyecto. Esta metodología fue dividida en dos partes a continuación detalladas:

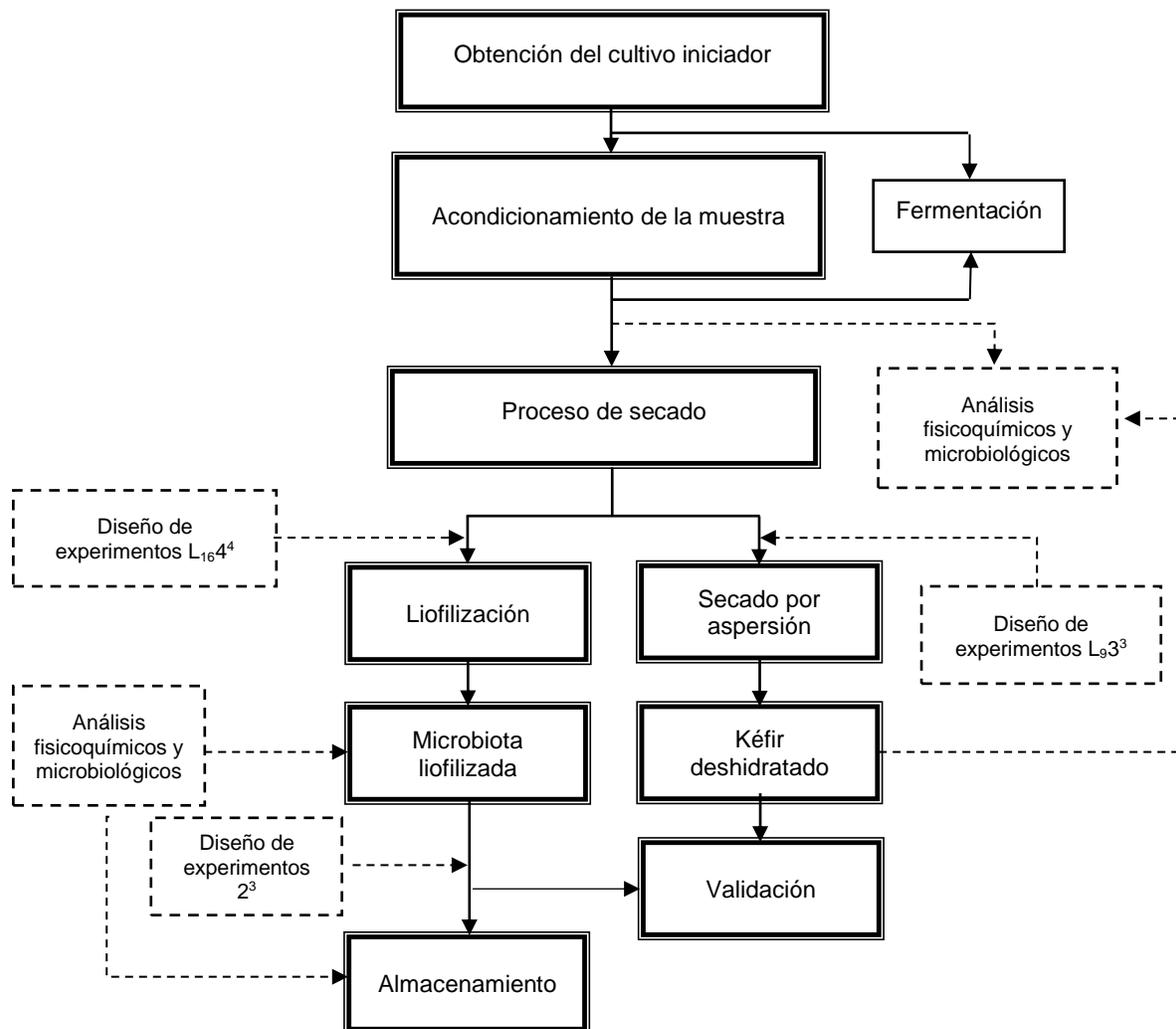


Figura 2.1 Metodología general aplicada para el secado de la microbiota del Kéfir y Kéfir

PARTE I

Desarrollo experimental de la liofilización de la microbiota de Kéfir

Este apartado engloba el desarrollo experimental de la liofilización de la microbiota de Kéfir. En esta etapa, fue realizado el acondicionamiento y caracterización fisicoquímica y microbiológica del cultivo iniciador (starter culture) así como su reproducción, analizando diferentes medios de cultivo y condiciones de fermentación para determinar las condiciones idóneas de crecimiento y viabilidad de microorganismos probióticos presentes en la microbiota del Kéfir, posteriormente se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la microbiota Kéfir antes y después del secado, analizando las condiciones de operación del secado por liofilización, en un liofilizador Mca. Labconco (Labconco Equipment Co., Kansas, USA) con capacidad de 12 l y un ultracongelador So-Low (Environmental equipment Cincinnati, Ohio, U.S.A) esta etapa en base al diseño de experimentos ortogonal según Taguchi $I_{16}4^4$, analizando las variables de respuesta del producto final obtenido tales como: % de humedad, a_w , parámetros de color L, a, b y ΔE , % de acidez (como ácido láctico), Log UFC/g de BAL y levaduras. Al término del análisis del secado se procedió a determinar y validar según Taguchi las condiciones más favorables de liofilización para la obtención de un producto viable. y por último se procedió a la evaluación del efecto de almacenamiento del producto liofilizado en base a un diseño de experimentos factorial 2^3 .

PARTE II

Desarrollo experimental del secado por aspersión del Kéfir

Esta etapa integra la fase experimental del secado por aspersión del Kéfir. En esta etapa se determinó en la fermentación acido-alcohólica la fase de crecimiento con mayor contenido de bacterias probióticas, una vez determinada esta etapa se realizaron los análisis fisicoquímicos y microbiológicos del Kéfir antes y después del secado, estudiando las condiciones de operación del secado por aspersión en un secador Mini Spray Dryer B-290, en base al diseño de experimento ortogonal según Taguchi L_93^3 analizando las variables de respuesta del producto final obtenido tales como: % de humedad, a_w , parámetros de color L, a, b y ΔE , % de acidez (como ácido láctico), Log UFC/g de BAL y

levaduras. Al término del estudio se procedió a la validación de las condiciones más favorables para la obtención de un producto viable.

2.2 Materia prima

Para el desarrollo de este Proyecto se utilizó un cultivo iniciador de granos o microbiota de Kéfir provenientes de cultivos artesanales de la región de Orizaba, Veracruz, México. Figura 2.2.



Figura 2.2 Cultivo iniciador de Kéfir

2.3 Selección y acondicionamiento de la muestra

Antes de iniciar con la reproducción de la microbiota, el cultivo iniciador fue acondicionado en el laboratorio en un diferentes medios de cultivo (Figura 2.3) que fue leche vegetal rehidratada y ultra pasteurizada con una aportación nutrimental de hidratos de carbono como azúcares 11 g, lípidos 7.2 de los cuales grasa saturada 6.5 g, proteínas 7.2 g, calcio 264 μ g, sodio 134 μ g, vitamina A equivalentes de retinol 145 μ g, vitamina D como colecalciferol 1.8 μ g, niacina 1.9 μ g, vitamina B6 202 mg, ácido fólico 19 μ g, esto en una porción de 240 mL durante 90 ciclos de 24 h con la finalidad de obtener una microbiota libre de contaminación y con características fisicoquímicas y microbiológicas homogéneas, al final se obtuvo una microbiota de Kéfir (Figura 2.4) de la cual para el secado por liofilización se seleccionaron granos de similar forma y tamaño (Figura 2.5) ya que como se puede observar en la Figura 2.6, la microbiota se caracteriza por tener diferentes tamaños y formas.



Figura 2.3 Acondicionamiento de la muestra



Figura 2.4 Microbiota de Kéfir



Figura 2.5 Selección de granos de Kéfir



Figura 2.6 Distintas formas y tamaños de la microbiota de Kéfir

Para el secado por aspersión el Kéfir obtenido a partir de este cultivo iniciador fue acondicionado en base al diseño de experimento mediante la adición de maltodextrina (ED-

10) en concentraciones señaladas en diseño de experimentos (20, 30 y 40%) con el objetivo de evitar la aglomeración y adherencia a la cámara de secado y proteger el material de los daños que pudiera ocasionar las altas temperaturas, manteniendo sus características fisicoquímicas y microbiológicas del material original. En la Figura 2.7 se muestra la maltodextrina utilizada y el acondicionamiento del Kéfir con maltodextrina en base al DOE.

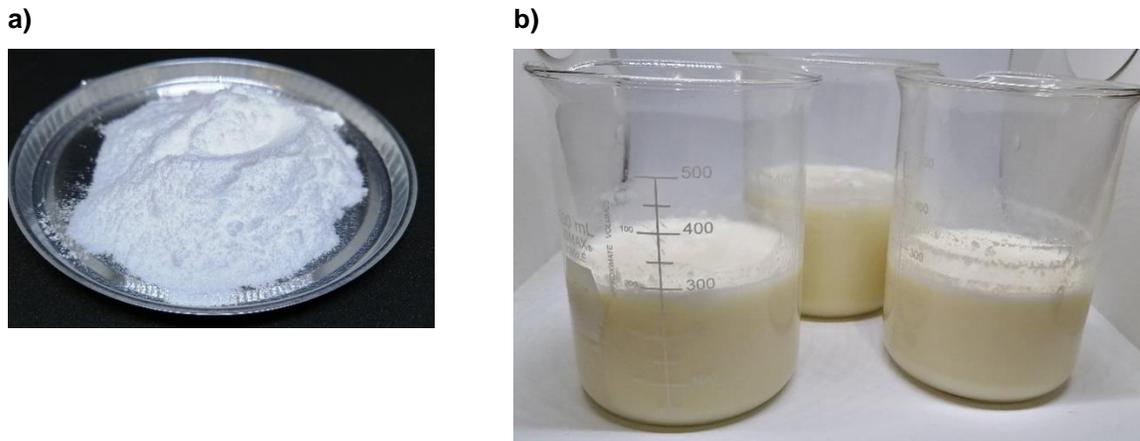


Figura 2.7 a) Maltodextrina y b) Kéfir acondicionado con maltodextrina 20, 30 y 40%

2.4 Fermentación

La fermentación fue realizada a nivel laboratorio a una temperatura promedio de 26°C, y 4°C. y una proporción p/V del 10%, en ciclos de 24 h c/u. Para la determinación del mayor número de microorganismos presentes fue determinada la curva de crecimiento a un tiempo de 12, 24, 36 y 48 horas (Figura 2.8).

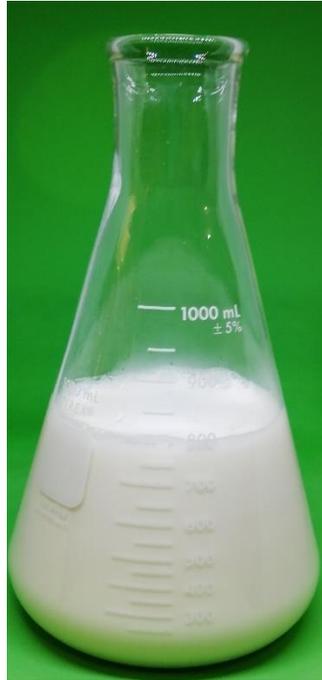


Figura 2.8 Fermentación para la elaboración del Kéfir

2.5 Reproducción de la microbiota

La microbiota que fue acondicionada y homogeneizada en el laboratorio fue utilizada como cultivo iniciador en diferentes medios de cultivo, con la finalidad de determinar su efecto en el incremento de la microbiota al término de un periodo de tiempo determinado. La fermentación fue llevada a cabo en una proporción del 10% (P/V), en ciclos de 24 h c/u y una temperatura promedio de 26°C.

Una vez determinado, el medio de cultivo que presentaba un mayor porcentaje en el crecimiento; se procedió a la reproducción continua de la microbiota en ese medio hasta la obtención de cantidades suficientes de microbiota (Figura 2.10), para ser sometida al secado por liofilización.



Figura 2.9 Microbiota reproducida en el laboratorio

2.6 Proceso de secado por liofilización

Para el proceso de secado se utilizarán equipos ubicados en el laboratorio de bioprocesos del Instituto Tecnológico de Orizaba, como un liofilizador Mca. Labconco Modelo 742004 (Labconco Equipment Co., Kansas, USA) con capacidad de 12 l (Figura 2.11). y un ultracongelador So-Low Modelo U85-13 (Environmental equipment Cincinnati, Ohio, U.S.A) (Figura 2.12). El liofilizador Marca. Labconco consiste en una cámara de secado de 12 L de capacidad del colector, un sistema de refrigeración que llega a los -84°C , y un sistema de control de vacío que va desde 2 a 0.12 mbar.



Figura 2.10 Liofilizador capacidad de 12 l Marca Labconco Modelo 742004



Figura 2.11 Ultracongelador So-low Modelo U85-13

Para realizar cada uno de los experimentos de liofilización, previamente se congeló el material en el ultracongelador en el tiempo y niveles establecidos en el diseño de experimentos (punto 2.7.1) posteriormente de forma manual se fijó en el equipo de liofilización la presión propuesta también en el diseño de experimentos. Una vez que el sistema alcanzó los -55°C y presión establecida, se colocaron los recipientes que contenían la microbiota de Kéfir a través de adaptadores de acero inoxidable; los cuales se conectan al liofilizador en los puertos de las válvulas de la cámara de secado y conector.

2.6.1 Diseño de experimentos

Con el objetivo de evaluar el efecto de los parámetros de operación sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del producto deshidratado, se aplicó un diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$, el cual permite en un reducido número de corridas evaluar distintas combinaciones de niveles preestablecidos; además, de evaluar individualmente los efectos de cada factor sobre las variables de respuesta. Los factores empleados para el secado por liofilización se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Factores y niveles para el diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$ del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir

Factores	Niveles			
	1	2	3	4
X ₁ : Tiempo de congelación (h)	3	5	7	9
X ₂ : Temperatura de congelación (°C)	-20	-40	-60	-80
X ₃ : Presión (mbar)	0.2	0.4	0.6	0.8
X ₄ : Tiempo de liofilización (h)	5	10	15	20

En la Tabla 2.2. se presenta el diseño de experimentos codificado, con cada uno de los experimentos realizados. Los valores 1, 2, 3 y 4 corresponden a los cuatro niveles de cada factor.

Tabla 2.2 Datos codificados para el diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$

Exp. No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	1	4	4	4
5	2	1	2	3
6	2	2	1	4
7	2	3	4	1
8	2	4	3	2
9	3	1	3	4
10	3	2	4	3
11	3	3	1	2
12	3	4	2	1
13	4	1	4	2
14	4	2	3	1
15	4	3	2	4
16	4	4	1	3

Las variables de respuesta evaluadas durante el proceso de secado por liofilización del microbiota de Kéfir fueron:

- Y₁: Humedad de la muestra (X)
- Y₂: Actividad de agua (a_w)
- Y_{3,4,5}: Parámetros de color L , a y b

- Y_6 : Diferencia de color (ΔE)
- Y_7 : UFC/g Bacterias ácido lácticas
- Y_8 : UFC/g Levaduras

2.6.2 Análisis estadístico

El efecto significativo de cada factor (variable de entrada) fue determinado por análisis de varianza de una sola vía a una $p < 0.1$ y $F > F_{crit} = 2.605525$, y $p < 0.05$ and $F > F_{crit} = 3.490295$. La importancia del efecto de cada factor sobre la variable de respuesta analizada fue también; observado en el rango máximo de los resultados obtenidos para cada una de ellas. Para cada variable de respuesta, fue obtenido el modelo matemático para predecir los valores de estas respuestas (Ecuación 2.1) con la ayuda del software estadístico Minitab 18. Además, el modelo matemático permitió analizar el comportamiento en función de los factores que afectaron significativamente a cada una de las variables de respuesta.

$$\begin{aligned} \gamma = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{44} X_4^2 + & 2.1 \\ & \beta_{12} X_1 X_2 \dots + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \end{aligned}$$

2.7 Proceso de secado por aspersión

Para el proceso de secado se utilizó un secador por aspersión mini spray dryer (Büchi Modelo B-290, Switzerland) equipo que mediante una bomba peristáltica hizo llegar el Kéfir hacia el atomizador, la atomización fue desarrollada con una boquilla de diámetro interno de 0.5 mm la cual utilizo aire comprimido conectado a un compresor con características... el flujo de aire máximo del secador es de 35 m³/h con una capacidad de evaporación de 1.0 L/h (Figura 2.13) y un compresor Mca. Pretul (Figura 2.14).



Figura 2.12 Mini spray dryer Mca. Büchi Modelo B-290



Figura 2.13 Compresor Pretul

2.7.1 Diseño de experimentos

Con la finalidad de evaluar el efecto de los parámetros de operación sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del producto deshidratado, se propuso un diseño de experimentos ortogonal L_93^3 , el cual permitió en un reducido número de corridas evaluar distintas combinaciones de niveles preestablecidos; además, de evaluar individualmente los efectos de cada factor sobre las variables de respuesta. Los factores empleados para el secado por aspersión se presentan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Factores y niveles para el diseño de experimentos ortogonal L_93^3 del proceso de secado por aspersión del Kéfir

Factores	Niveles		
	1	2	3
X ₁ : Temperatura del aire de entrada (°C)	125	135	145
X ₂ : Concentración de maltodextrina (% M)	20	30	40
X ₃ : Temperatura del aire de salida (°C)	70	75	80

En la Tabla 2.4 se presenta el diseño de experimentos codificado, con cada uno de los experimentos realizados. Los valores 1, 2, y 3 corresponden a los tres niveles de cada factor (variables de entrada).

Tabla 2.4 Datos codificados para el diseño de experimentos ortogonal L_93^3

Exp. No.	X ₁	X ₂	X ₃
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

X₁ (Temperatura del aire de entrada °C) X₂ (%Maltodextrina) X₃ (Temperatura del aire de salida °C)

Las variables de respuesta evaluadas durante el proceso de secado por aspersión fueron:

- Y₁: Humedad de la muestra (% X)
- Y₂: Actividad de agua (a_w)
- Y_{3,4,5}: Parámetros de color L , a y b
- Y₆: Diferencia de color (ΔE)
- Y₇: Acidez (g de ácido láctico)

- Y_8 : Log UFC/g Bacterias ácido-lácticas
- Y_9 : Log UFC/g Levaduras

2.7.2 Análisis estadístico

Adicional a lo anterior, el efecto significativo de cada factor (variable de entrada) fue determinado por análisis de varianza de una sola vía a una $p < 0.1$ y $F > F_{crit} = 3.46330$, y $p < 0.05$ and $F > F_{crit} = 5.14325$. La importancia del efecto de cada factor sobre la variable de respuesta analizada fue también observado en el rango máximo de los resultados obtenidos para cada una de ellas. Regresión múltiple (Minitab 18.0) fue utilizada con base en la Ecuación 2.2 para la obtención de modelos matemáticos de segundo orden, que permitieran predecir el comportamiento de las propiedades finales del producto deshidratado y los parámetros de operación establecidos en el diseño de experimentos.

$$\begin{aligned} \gamma = & \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + & 2.2 \\ & \beta_{12} X_1 X_2 \dots + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{14} X_1 X_4 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{24} X_2 X_4 + \beta_{34} X_3 X_4 \end{aligned}$$

2.8 Análisis fisicoquímicos

Con la finalidad de caracterizar la microbiota de Kéfir y Kéfir antes y después de los procesos de secado se realizaron los análisis fisicoquímicos que se describen a continuación:

2.8.1 Humedad y sólidos totales

Para determinar el contenido de humedad de cada una de las muestras se empleó una termobalanza modelo MA35 Marca Sartorius. Todas las muestras fueron determinadas bajo condiciones similares, colocando en un platillo de aluminio aproximadamente 0.5 g de muestra distribuida homogéneamente a una temperatura de 65 °C hasta alcanzar peso constante. Por diferencia de peso se obtuvo el valor de los sólidos totales (ST). (Figura 2.14).



Figura 2.14 Termobalanza Sartorius

2.8.2 Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua (a_w) fue obtenida usando un medidor de actividad de agua Marca Aqualab serie 3 modelo TE (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA)., este instrumento emplea la técnica de punto de rocío; donde, en una cámara sellada la muestra se mantiene en equilibrio y, en equilibrio la humedad relativa del aire en la cámara equivale a la actividad de agua de la muestra. Las mediciones se realizaron en similares condiciones, colocando una muestra aproximada de 1 g de producto en una capsula de polietileno, la cual es introducida a la cámara a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, automáticamente el equipo indica el momento en que se ha concluido la medición, señalando el valor de la actividad de agua de la muestra (Figura 2.15).

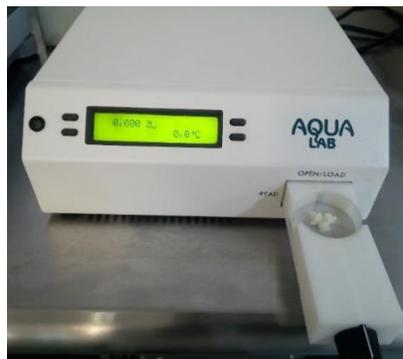


Figura 2.15 Medidor de a_w AQUA LAB

2.8.3 Color

Para determinar el color en las muestras solidas fue empleado un MiniScan XE Plus Hunter Lab. (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA, USA) (Figura 2.16) y para las muestras liquidas fue utilizado un colorímetro ColorQuest XE HunterLab (Figura 2.17) con el uso del software versión 4.10, se obtuvieron los parámetros de color expresados en unidades Hunter Lab: luminosidad L , cromaticidad a y b . con estos parámetros se obtuvo la diferencia de color (ΔE) con la Ecuación 2.3.



Figura 2.16 MiniScan XE Plus Hunter Lab



Figura 2.17 colorímetro ColorQuest XE HunterLab

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad 2.3$$

Donde:

$$\Delta L = L_2 - L_1 \quad 2.4$$

$$\Delta a = a_2 - a_1 \quad 2.5$$

$$\Delta b = b_2 - b_1 \quad 2.6$$

2.8.4 % acidez y pH

La acidez titulable se determinó como % de ácido láctico, para la muestra líquida se colocaron 10 mL de muestra en un matraz Erlenmeyer de 125mL y para las muestras en polvo se pesaron 2 gr ± 0.01 también en un matraz Erlenmeyer de

125mL, a la muestra en polvo se adicionaron 50 ml de agua destilada y a ambas muestras se les agregaron cinco gotas de fenolftaleína como indicador titulando con Hidróxido de sodio 0.1 N hasta obtener un color rosa permanente. Para representar el resultado se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ acidez titulable} = \frac{\text{mL de NaOH} * N * 0.009}{\text{muestra}} * 100 \quad 2.7$$

El pH de las muestras fue determinado a 25°C con un pH-metro portátil modelo pH10 Marca Conductronic con un electrodo P100C, mismo que fue calibrado antes de cada análisis con solución Buffer pH 4.0 +-0.02 y pH 7.0 +-0.02 a 25°C Marca Hach (Figura 2.18).



Figura 2.18 Potenciómetro pH10 Marca Conductronic

2.9 Análisis microbiológicos

Para los análisis microbiológicos, dependiendo el tipo de muestra 1 gr o 1 ml de ella fue licuada en 99 ml de agua peptonada. Posteriormente se prepararon una serie de diluciones para ser inoculadas en el medio indicado (NOM-110-SSA1-1994) por el método de (placa vertida (Figura 2.19). cada prueba fue realizada por duplicado y los resultados fueron expresados como Log UFC/g de producto.



Figura 2.19 Siembra por el método de Placa vertida

2.9.1 Determinación de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas fueron enumeradas a través de la técnica de placa vertida utilizando como medio de cultivo Agar MRS (Dibico). Para ello 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} fueron colocadas en cajas Petri, agregando posteriormente 20 ml de Agar a 35°C y homogeneizando, el inoculo con el medio cuidadosamente, dejando reposar hasta solidificada la muestra. Se invirtieron las placas para ser llevadas a la incubadora durante un tiempo de 3 días a una temperatura de 35°C , los resultados obtenidos de expresaron en Log UFC/g. Se utilizo un control para verificar que no existiera contaminación.

2.9.2 Determinación de levaduras

Las Levaduras fueron enumeradas a través de la técnica de placa vertida utilizando como medio de cultivo Agar YPD (Difco). Para ello 1 mL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} fueron colocadas en cajas Petri, agregando posteriormente 20 ml de Agar a 35°C homogeneizando el inoculo con el medio cuidadosamente, dejando reposar hasta solidificada la muestra. Se invirtieron las placas para ser llevadas a la incubadora durante un tiempo de 5 días a una temperatura de 25°C , los resultados obtenidos de expresaron en Log UFC/g. Se utilizo un control para verificar que no existiera contaminación.

2.10 Almacenamiento de la microbiota de Kéfir liofilizada

Posterior a la elaboración o fabricación de un producto, viene la etapa de almacenamiento en donde el producto es conservado hasta hacerlo llegar al usuario final. Durante este periodo una o varias características de calidad pueden llegar a modificar y afectar el

producto. Cuando el producto se ha deteriorado hasta el punto de considerarse inadecuado para el consumo, se dice que ha llegado al final de su vida útil; por lo que, al estudiar la vida útil de los alimentos, es importante analizar las condiciones y los cambios que dan lugar durante el tiempo de almacenamiento. Para evaluar el efecto del almacenamiento sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas de la microbiota de Kéfir liofilizada, se emplearon muestras de 1 ± 0.1 g, las cuales fueron empacadas en bolsas de polietileno y metalizadas (medidas y grosor). Las muestras fueron selladas con una empacadora marca Food Saver (modelo: FSFSSL3880) con atmosfera al vacío y atmosfera modificada con nitrógeno (N_2) en el caso de estas últimas muestras con atmosfera modifica, el nitrógeno inyectado contenía un 99.7% de pureza. El análisis y evaluación del almacenamiento fue llevado a cabo durante un periodo de 120 días, analizando en intervalos de tiempo (cada 5 días durante el primer mes, cada 10 días durante el segundo mes, cada 15 días durante el tercer mes y 30 días al cuarto mes) su estabilidad; además de realizar la caracterización fisicoquímica y microbiológica de cada uno de los experimentos.

2.10.1 Diseño de experimentos

Se utilizó un diseño de experimentos factorial 2^3 (Tabla 2.5). En este diseño fue empleada una variable cuantitativa (temperatura de almacenamiento) y dos variables cualitativas (tipo de empaque y atmosfera), con un total de ocho experimentos (Tabla 2.6). Los resultados fueron analizados con Minitab 18.0, realizando un análisis estadístico mediante el análisis de varianza a $\alpha=0.05$ para determinar el efecto significativo de cada factor.

Tabla 2.5 Factores y niveles para el diseño de experimentos factorial del análisis de almacenamiento de la microbiota del Kéfir

Factores	Niveles	
	1	-1
Temperatura de almacenamiento (°C)	26	4
Atmosfera	Vacío	Nitrógeno
Empaque	Polietileno	Metalizado

Tabla 2.6 Datos codificados del diseño de experimentos factorial 2^3 para el análisis de almacenamiento de la microbiota de Kéfir

Exp. No.	Temperatura (°C)	Atmosfera	Empaque
1	-1	1	1
2	-1	-1	-1
3	1	-1	-1
4	-1	-1	1
5	1	1	1
6	-1	1	-1
7	1	-1	1
8	1	1	-1

Las variables de respuesta evaluadas en la etapa de almacenamiento son:

- Y_1 : Humedad de la muestra (% X)
- Y_2 : Actividad de agua (a_w)
- Y_3 : Diferencia de color (ΔE)
- Y_4 : Evolución del Peso (W)
- Y_5 : UFC/g bacterias ácido lácticas
- Y_6 : UFC/g levaduras

2.10.2 Empaque de la microbiota deshidratada

Las muestras de la microbiota liofilizada fueron empacadas en dos tipos de empaque, polietileno acanalado y metalizadas. (Figura 2.20). Todas las muestras fueron selladas con una empacadora marca Food Saver (modelo: FSFSSL3880, Sunbeam Mexicana) en atmosfera al vacío y atmosfera modificada con N_2 .



Figura 2.20 Empaque de polietileno y metalizado

2.11 Condiciones óptimas propuestas por Taguchi para el proceso de secado por liofilización y secado por aspersión

Para determinar las condiciones óptimas de operación en el secado por liofilización y el secado aspersión de acuerdo a la metodología Taguchi, fueron consideradas los principales efectos de cada una de las variables de entrada o factores con respecto al objetivo de respuesta deseado como lo más pequeño es mejor", "lo más grande es mejor" o "lo nominal es lo mejor. Así también se consideró la contribución individual de cada nivel sobre el resultado final de la variable de respuesta analizada.

2.11.1 Validación de las condiciones propuestas

Una vez obtenidas las mejores condiciones de operación propuestas por Taguchi, se realizaron corridas experimentales para validar los resultados y condiciones propuestas.

2.12 Error relativo

Una vez determinados los valores predichos por los modelos matemáticos de segundo orden, para cada una de las variables de respuesta y procesos de secado, se determinó el porcentaje de error relativo entre el valor experimental y el predicho siguiendo la Ecuación 2.8:

$$E_R = \frac{(V_{pred} - V_{exp})}{V_{exp}} \times 100 \quad 2.8$$

Donde: E_R = error relativo, V_{pred} = valor predicho, V_{exp} = valor experimental

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Parte I Resultados experimentales del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir

3.1 Acondicionamiento de la muestra

La microbiota de Kéfir fue obtenida de cultivos artesanales de la zona centro del estado de Veracruz; en donde para su acondicionamiento en el laboratorio (Figura 3.1), se empleó leche con grasa vegetal rehidratada y ultra pasteurizada con una aportación nutricional de hidratos de carbono como azúcares 11 g, lípidos 7.2 de los cuales grasa saturada 6.5 g, proteínas 7.2 g, calcio 264 µg, sodio 134 µg, vitamina A equivalentes de retinol 145 µg, vitamina D como colecalciferol 1.8 µg, niacina 1.9 µg, vitamina B6 202 mg, ácido fólico 19 µg, esto en una porción de 240 mL.

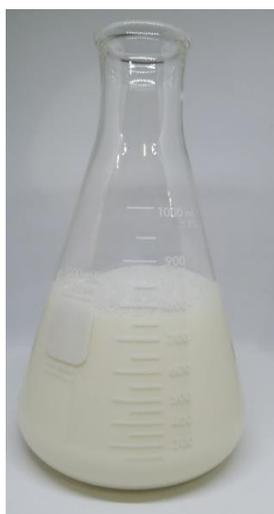


Figura 3.1 Acondicionamiento de la muestra

3.2 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la microbiota de Kéfir

Antes de ser sometida al proceso de secado por liofilización la microbiota fue caracterizada fisicoquímica y microbiológicamente. Los resultados se presentan en la Tabla 3.1.



Figura 3.2 Granos de Kéfir obtenidos en el laboratorio

Tabla 3.1 Caracterización fisicoquímica y microbiológica de la microbiota de Kéfir

Análisis	Resultado
Humedad (%X)	74.24
Sólidos totales (%)	25.76
Actividad de agua (a_w)	0.988
Parámetro de color L	37.07
Parámetro de color a	-1.06
Parámetro de color b	2.53
Diferencia de color (ΔE)	49.37
Log UFC/g bacterias ácido lácticas	9.05
Log UFC/g Levaduras	8.90

Como se muestra en la Tabla 3.2, el contenido de humedad en la microbiota de Kéfir se encuentra por arriba del 70% con a_w de 0.988, por lo que este producto tiende a una alta inestabilidad haciéndolo susceptible al crecimiento microbiano y a las reacciones enzimáticas afectando su calidad y viabilidad durante el almacenamiento (Norbrillinda et al., 2016). Sin embargo, también se puede notar el alto contenido de sólidos, lo que hace a este cultivo iniciador un candidato idóneo para el secado por liofilización. En relación con los parámetros de color, los resultados de luminosidad L , y la cromaticidad a y b indican que la microbiota de Kéfir presenta un ligero color gris, y tenue color verde-amarillo, con una diferencia de color respecto a una placa blanca de 49.37 (Figura 3.3).

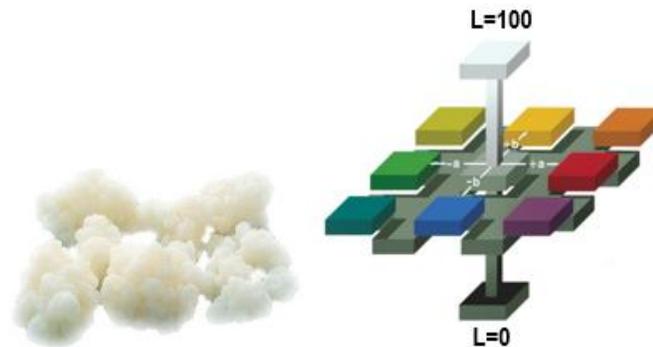


Figura 3.3 Microbiota de Kéfir y diagrama Hunter L, a, b

3.3 Fermentación inicial

La fermentación inicial, fue llevada a cabo a dos diferentes temperaturas en (6 y 26°C), durante un periodo de 48 horas, parámetros como el pH, % de sólidos y el color (luminosidad L , cromaticidad a y b y diferencia de color ΔE) fueron analizados en intervalos de tiempo de 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h. Los resultados del proceso de fermentación para la producción inicial del Kéfir se presentan en la Figura 3.4. En la cual se observa un decremento importante en el pH inicial a través del tiempo de fermentación para ambas muestras; así como, en el % de sólidos totales. En el caso de los sólidos totales autores como Motta-Delgado et al. (2014) hacen mención que los sólidos totales se ven disminuidos por el incremento de la flora microbiana, que de acuerdo con (Celis & Juárez, 2009)

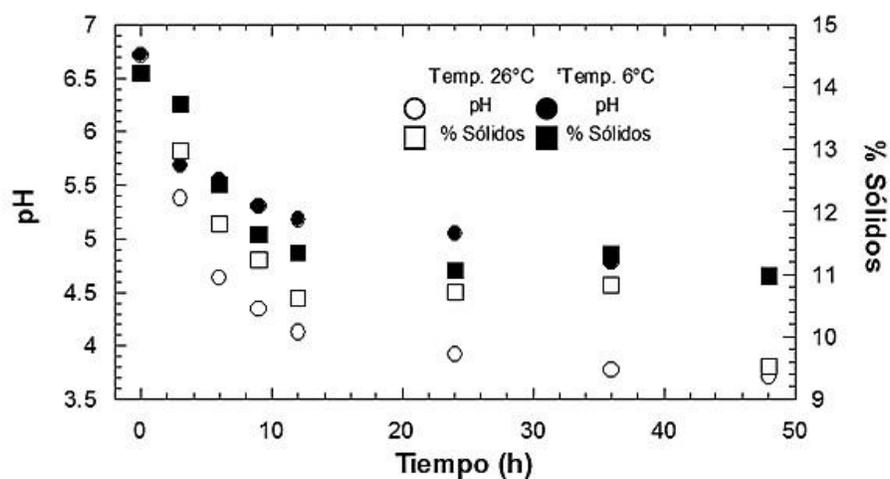


Figura 3.4 Efecto de la temperatura sobre el pH y el contenido de sólidos durante la fermentación de Kéfir

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados de los parámetros de color los cuales no fueron afectados significativamente por la temperatura y tiempo de fermentación. Al término de la fermentación (48h) y a temperatura de 26°C, el incremento de biomasa fue del 15% con respecto al peso de la biomasa inicial utilizada, no obteniendo un incremento de biomasa en la fermentación realizada a 6°C.

Tabla 3.2 Resultados de los parámetros de color L, a, b y ΔE

Tiempo (h)	Fermentación 26°C				Fermentación 6°C			
	L	a	b	ΔE	L	a	b	ΔE
0	18.08	2.09	10.5	0	18.08	2.09	10.5	0
3	16.64	1.82	9.58	3.66	17.94	2.05	10.36	0.53
6	17.45	1.68	9.9	2.39	18.53	1.92	10.48	0.83
9	16.24	2.05	9.05	4.91	18.75	1.85	10.52	1.12
12	16.8	2.00	9.56	3.65	18.16	2.07	10.33	0.84
24	17.66	1.75	9.87	2.54	17.51	1.89	10.01	1.89
36	17.23	2.11	9.54	3.69	16.83	1.78	9.53	3.79
48	17.47	2.22	9.75	2.92	16.55	1.91	9.65	3.45

3.3.1 Fase de crecimiento

Con la finalidad, de identificar el medio de cultivo en donde se obtenga la mayor viabilidad además de incrementar la posibilidad de supervivencia de los microorganismos probióticos en el medio después del secado por aspersión, se acondiciono la microbiota en cuatro muestras diferentes de medios de cultivo durante diez ciclos de 24 horas de fermentación cada uno a una temperatura promedio de 26°C, permitiendo la adaptación del microorganismo al medio de cultivo correspondiente. Posterior a ello, se procedió a determinar la viabilidad de las muestras mediante la siembra en placa seleccionando el medio con mayor crecimiento para realizar la cinética de crecimiento, los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3.3:

Tabla 3.3 Contenido de microorganismos probióticos en 4 diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	BAL (UFC/ml)	Log (UFC/ml) BAL	Levaduras (UFC/ml)	Log (UFC/ml) Levaduras
1	4.3 x 10 ⁶	6.63	4.6 x 10 ⁶	6.66
2	3.6 x 10 ⁶	6.56	3.7 x 10 ⁶	6.57
3	2.2 x 10 ⁷	7.34	3.4 x 10 ⁷	7.53
4	3.9 x 10 ⁶	6.59	4.0 x 10 ⁶	6.60

1) San Marcos semidescremada, 2) Fortileche, 3) Lala entera, 4) Alpura entera

Aplicando las pruebas de Duncan's Multiple-Comparison Test y Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test para comparación de medias se encontró que no existía una diferencia estadísticamente significativa en el contenido de UFC de BAL y levaduras de los cuatro medios de cultivo analizados por lo que; sería indistinto, utilizar cualquiera de ellos. Sin embargo, se determinó realizar la cinética de crecimiento utilizando los medios de cultivo 1 y 3 que presentaron el mayor resultado en UFC/ml

Los resultados de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de los medios de cultivo se presentan a continuación en las Tablas 3.4 y 3.5.

Tabla 3.4 Propiedades fisicoquímicas de la fermentación de kéfir en el medio de cultivo No. 1

Muestra	Tiempo (h)	Ac. Titulable g/l (ácido láctico)	pH	% Sólidos	L	a	b	ΔE
1	0	1.04	6.74	12.99	15.32	4.40	9.59	-
2	12	0.40	5.09	12.31	15.73	4.15	9.70	0.84
3	24	0.79	3.87	13.28	16.20	4.16	9.85	1.57
4	36	1.50	3.04	11.37	16.14	4.13	9.80	1.45
5	48	1.18	3.26	11.29	16.00	3.97	9.73	1.32

L: luminosidad, a: cromaticidad en a, b: cromaticidad en b; ΔE: diferencia de color

Tabla 3.5 Propiedades fisicoquímicas de la fermentación de kéfir en el medio de cultivo No. 3

Muestra	Tiempo (h)	Ac. Titulable g/l (ácido láctico)	pH	% Sólidos	L	a	b	ΔE
1	0	1.04	6.74	12.99	15.32	4.40	9.59	-
2	12	0.78	4.21	12.20	15.68	4.19	9.59	0.64
3	24	1.22	3.46	12.25	16.24	4.14	9.89	1.71
4	36	2.08	2.79	11.32	16.19	4.11	9.82	1.54
5	48	1.80	2.88	11.22	16.03	3.98	9.73	1.35

Los probióticos usualmente son procesados durante la fase exponencial tardía o durante la fase estacionaria temprana, en la que se alcanza un rendimiento máximo. No obstante la fase estacionaria temprana es mencionada con más frecuencia como óptima que la fase exponencial; ya que, de acuerdo a (Peighambardoust et al., 2011) los microorganismos muestran una mayor resistencia y viabilidad para ser sometidas al proceso de secado. Igualmente, para asegurar la supervivencia de los microorganismos probióticos durante todo el proceso de secado, se debe asegurar el mayor número de microorganismos posibles, en las Tablas 3.6 y 3.7 se presenta los datos de crecimiento de las dos muestras seleccionadas.

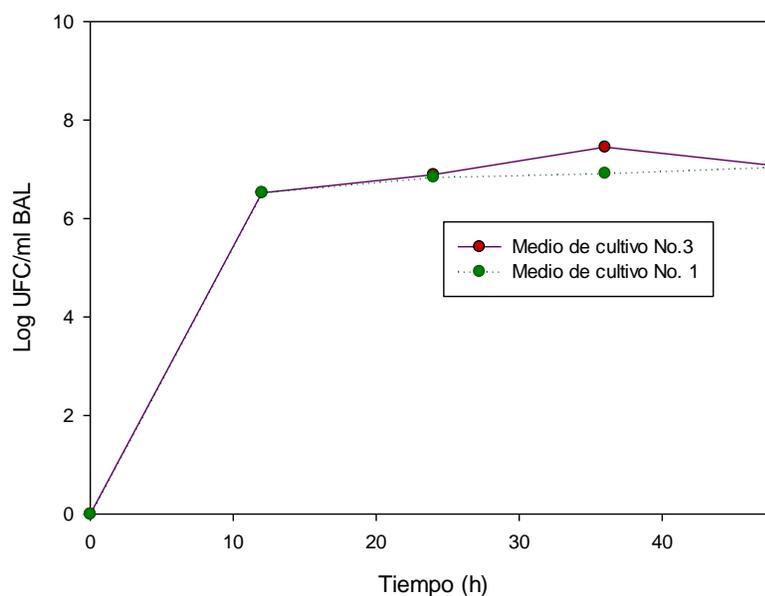
Tabla 3.6 Cinética de crecimiento en medio de cultivo No. 1

Muestra	Tiempo (h)	BAL (UFC/ml)	Log (UFC/ml) BAL	Levaduras (UFC/ml)	Log (UFC/ml) Levaduras
1	0	0	-	0	-
2	12	3.4×10^6	6.53	4.4×10^6	6.65
3	24	6.8×10^6	6.84	3.9×10^7	7.59
4	36	8.2×10^6	6.92	2.8×10^8	8.16
5	48	1.1×10^7	7.05	5.6×10^7	7.75

Tabla 3.7 Cinética de crecimiento en medio de cultivo No. 3

Muestra	Tiempo (h)	BAL (UFC/ml)	Log (UFC/ml) BAL	Levaduras (UFC/ml)	Log (UFC/ml) Levaduras
1	0	0	-	0	-
2	12	3.2×10^6	6.52	6.1×10^6	6.79
3	24	7.7×10^6	6.89	2.7×10^7	7.43
4	36	2.8×10^7	7.45	3.7×10^7	7.57
5	48	1.1×10^7	7.07	3.5×10^7	7.54

Aplicando las pruebas de Duncan's Multiple-Comparison Test y Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test para comparación de medias se determinó que no existe una diferencia estadística significativa en el contenido de UFC de BAL y levaduras de los dos medios de cultivo analizados por lo que; sería estadísticamente indistinto, utilizar cualquiera de ellos; sin embargo se determinó utilizar el medio de cultivo 3 al obtener en promedio la mayor viabilidad para ser sometida al proceso de secado por aspersión. En las Figuras 3.5 y 3.6 se presenta gráficamente la fase de crecimiento de estos dos medios.

**Figura 3.5** Cinética de crecimiento Log UFC/ml BAL

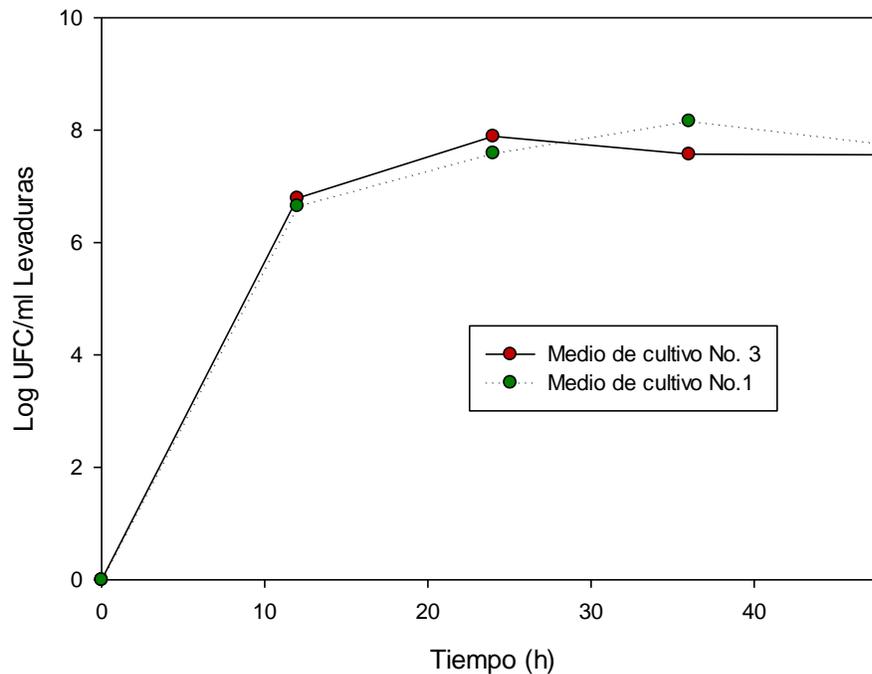


Figura 3.6 Cinética de crecimiento Log UFC/ml Levaduras

Aunque; el contenido de microorganismo probióticos era adecuado para ser sometido al secado por aspersión, no fue factible utilizar estos medios para el secado ya que, también se debe de considerar que el producto que entre al secador debe de responder a las condiciones necesarias para que este no se adhiera y apelmace en la cámara de secado como paso con las corridas experimentales previas; en este punto cabe resaltar que se realizaron adicionalmente múltiples experimentos con diferentes medios de cultivo bajos en grasa; que a la vez permitieran durante el proceso de fermentación, un alto contenido de bacterias probióticas previo al secado.

El medio de cultivo con mayor éxito fue el un medio de cultivo descrito como leche parcialmente descremada, ultra pasteurizada, con una aportación nutrimental de hidratos de carbono como azúcares 12 g, lípidos 2.5 de los cuales como grasa saturada 1.6 g, proteínas 7.8 g, calcio 290 μg , sodio 116 μg , vitamina A equivalentes de retinol 145 μg , vitamina D 1.25 μg , vitamina A 166 mg (equivalentes de retinol) esto en una porción de 240 mL.

La fase de crecimiento de los microorganismos se presenta en la Figura 3.7, a partir de esta gráfica se puede determinar que, durante la fermentación a un tiempo de 24 h, el Kéfir contiene el mayor número de microorganismos probióticos, susceptibles a ser sometidos al proceso de secado por aspersión.

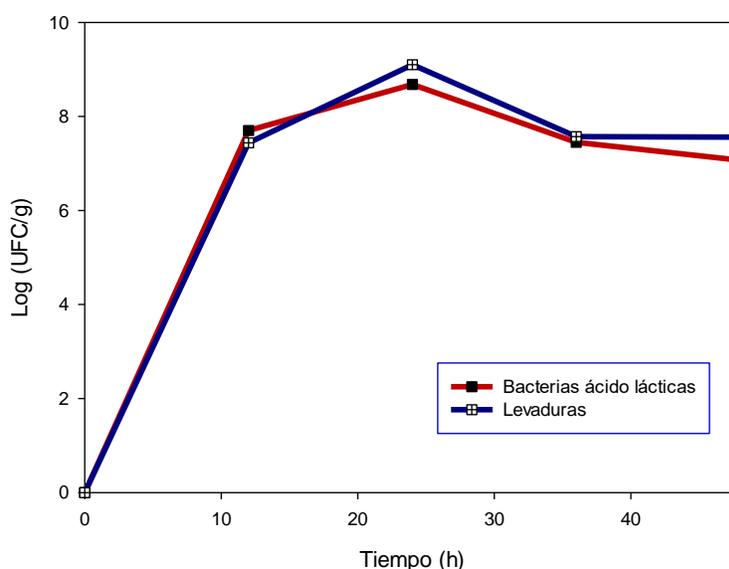


Figura 3.7 Fase de crecimiento de las bacterias ácido lácticas y levaduras presentes en el Kéfir

3.4 Reproducción de la microbiota

La microbiota fue inoculada en seis diferentes medios de cultivo diferentes y llevadas a 10 ciclos de fermentación y una temperatura de 26°C, con la finalidad de determinar su efecto en el incremento de la biomasa, al término de un periodo de tiempo determinado, dichos resultados se encuentran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8 Efecto de distintos medios de cultivo sobre el incremento de la biomasa

Medio	W_i	W_f	ΔW	$\% \Delta W$
1	10.026	17.939	7.9123	78.92
2	10.021	16.478	6.457	64.44
3	10.031	17.522	7.4911	74.68
4	10.03	15.903	5.8724	58.55
5	10.018	14.272	4.2532	42.45
6	10.022	18.27	8.2485	82.31

Los resultados obtenidos muestran que en los medios de cultivo 1, 3 y 6 tuvieron un incremento mayor con relación a los medios de cultivo restantes. Estos tres medios fueron llevados a fermentaciones posteriores con la finalidad de evaluar si existía una diferencia estadísticamente significativa en la obtención de la biomasa, los promedios del crecimiento se presentan en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9 Promedio de crecimiento de la biomasa en tres medios específicos

Medio	W_i	W_f	ΔW	$\% \Delta W$
1	10.0255	16.7293	6.7037	66.8700
3	10.0266	18.0250	7.9984	79.7684
6	10.0233	17.5601	7.5368	75.1927

A estos tres medios se aplicaron Duncan's Multiple-Comparison Test y Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test. Dichas pruebas de comparación de medias mostraron que no existe una diferencia estadística significativa en el crecimiento de la biomasa de estos tres medios de cultivo; por lo que, sería estadísticamente indistinto utilizar cualquiera de ellos.

3.5 Secado por liofilización

Las variables de respuesta analizadas en el secado por liofilización de la microbiota de Kéfir fueron: el contenido de humedad, actividad de agua, parámetros de color, diferencia de color, contenido de bacterias ácido-lácticas y levaduras.

3.5.1 Humedad y actividad de agua en la microbiota de Kéfir liofilizada

En la Tabla 3.10 se presentan los resultados experimentales obtenidos del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir, para las variables de respuesta Y_1 : % contenido de humedad y Y_2 : actividad de agua (a_w). Tanto la humedad como la actividad de agua presentes en alimentos deshidratados son los factores más importantes que afectan su calidad y viabilidad durante el almacenamiento. Un alto contenido de humedad y a_w en los alimentos frescos son razones de una vida de anaquel reducida, ya que por el agua libre y disponibilidad en el alimento este está expuesto a diversas reacciones microbiológicas, químicas y bioquímicas. Por lo que un proceso de secado adecuado permitirá reducir estos niveles de agua libre y ligada, teniendo en cuenta para el caso de alimentos probióticos que las condiciones de secado deben ser seleccionadas de tal manera que el microorganismo

sobreviva a lo largo de todo el proceso esto debido a que, durante el secado la a_w produce daños estructurales en la pared celular, decreciendo su viabilidad (Tymczynsyn et al., 2007).

Tabla 3.10 Valores experimentales para las variables de respuesta % X y a_w

Exp. No.	X ₁ tc (h)	X ₂ Tc (°C)	X ₃ P (mbar)	X ₄ tl (h)	Y ₁ % X	Y ₂ a_w
1	1	1	1	1	11.84	0.173
2	1	2	2	2	4.84	0.111
3	1	3	3	3	3.08	0.114
4	1	4	4	4	3.25	0.131
5	2	1	2	3	4.84	0.111
6	2	2	1	4	2.38	0.137
7	2	3	4	1	65.33	0.983
8	2	4	3	2	26.85	0.494
9	3	1	3	4	2.94	0.136
10	3	2	4	3	3.95	0.210
11	3	3	1	2	3.45	0.092
12	3	4	2	1	60.43	0.986
13	4	1	4	2	10.93	0.557
14	4	2	3	1	51.09	0.972
15	4	3	2	4	7.25	0.107
16	4	4	1	3	3.79	0.076

De la Tabla 3.10 también se puede observar valores superiores de humedad del 10% en experimentos que corresponden a niveles de presión entre 0.2-0.4 mbar con un tiempo de liofilización entre 5 y 10 h, así como la mayor a_w se presenta en los experimentos 7, 12 y 14 con a_w superiores al 0.9 estos resultados debido al tiempos reducidos de liofilización (5 h). No obstante, también se obtuvieron valores de % X < 5% y a_w < 0.6 el valor más bajo de a_w =0.076 en condiciones de 9 h de congelamiento a una temperatura de -80°C, presión de 0.2 mbar y un tiempo de liofilización de 15 h, resultados con los que se puede afirmar que el producto final obtenido, es estable microbiológicamente. Ya que, si la humedad es menor al 5% y la a_w es inferior a 0,60 se asegura la inactivación del crecimiento microbiano y la oxidación de lípidos en los productos alimenticios durante el almacenamiento (Su & Mujumdar, 2015).

La actividad del agua es diferente a la de la tienda de humedad, ya que mide la disponibilidad de agua libre en un sistema alimentario que es responsable de cualquier reacción bioquímica, mientras que el contenido de humedad representa la composición del agua en un sistema alimentario. La alta actividad del agua indica que hay más agua libre disponible para reacciones bioquímicas y, por lo tanto, una vida útil más corta. En general, los alimentos con $a_w < 0,6$ se consideran microbiológicamente estables y, si se produce algún deterioro, se induce por reacciones químicas y no por microorganismos.

3.5.1.1 Análisis estadístico del contenido de humedad

En la Tabla 3.11 se muestra el análisis de varianza del % de contenido de humedad que se obtuvieron en el proceso de secado de la microbiota. Los resultados revelan que los cuatro niveles seleccionados del tiempo y la temperatura de congelamiento, así como la presión no afectaron significativamente a esta variable de respuesta, pero el tiempo de liofilización en todos los niveles seleccionados tuvo un efecto significativo ($p = 0.00163 < 0.1$ and $F = 9.62136 > F_{crit} = 2.605525$ and $p = 0.00163 < 0.05$ and $F = 9.62136 > F_{crit}=3.490295$). Lo cual es consistente con las conclusiones de otras investigaciones (Searles et al., 2017; Pisano et al., 2010; Passot *et al.*, 2009; Chouvinc, et al., 2004) esto debido a que; el secado secundario (desorción) durante la liofilización ocupa un papel importante en la remoción del contenido de humedad del producto deshidratado.

Tabla 3.11 Análisis de varianza la variable de respuesta % X

Análisis de datos para % X	Factores			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
K ₁	23.01	30.55	21.46	188.69
K ₂	99.40	62.26	77.36	46.07
K ₃	70.77	79.11	83.95	15.66
K ₄	73.06	94.32	83.46	15.82
R	76.39	63.78	62.49	173.03
F	0.46713	0.33514	0.41678	9.62136
p Value	0.71063	0.80025	0.74417	0.00163

3.5.1.2 Modelo matemático para predecir la humedad

De acuerdo con el análisis de regresión múltiple de los resultados de los experimentos ortogonales L₁₆4⁴, y en base a la ecuación de regresión 2.1, referida en el capítulo 2, se

presenta el modelo de regresión de segundo orden codificado para la predicción de esta variable de respuesta (Ecuación 3.1). Este modelo representa la relación entre la variable dependiente (Y_1 : Contenido de humedad) respecto a las variables independientes (X_1 : tiempo de congelación, X_2 : temperatura de congelación, X_3 : presión, X_4 : tiempo de liofilización).

$$Y_1 = 12.3 + 12.7X_1 - 10.59X_2 + 36.60X_3 - 38.85X_4 - 2.74X_1^2 + 4.29X_1X_2 - 0.97X_1X_3 - 2.460X_1X_4 + 1.143X_2^2 - 0.80X_2X_4 - 3.12X_3^2 - 4.348X_3X_4 + 8.924X_4^2 \quad 3.1$$

Para este modelo, el coeficiente correlación (R^2) fue de 0.9974 donde el mayor coeficiente (38.85) corresponde al tiempo de liofilización y fue el valor más grande obtenido de todos coeficientes de la ecuación; lo que indica, que el tiempo de liofilización afecta el % de humedad de la microbiota de Kéfir liofilizada; por otra parte, los coeficientes (36.60 y 12.70) para la presión y el tiempo de congelamiento fueron los coeficientes con un valor mayor que los coeficientes restantes.

De acuerdo a la Ecuación 3.1, se presentan en la Figura 3.8, los valores predichos de Y_1 para la microbiota de Kéfir liofilizada a diferentes tiempos de congelación y presiones. El tiempo de liofilización y la temperatura de congelamiento fueron consideradas en 5 h y -20°C respectivamente. La Figura 3.1 muestra que el %X incrementa con el aumento de la presión y con un tiempo de congelación de 5 h. También es observado que cuando la presión es menor a 0.1 el % X decrece. La Tabla 3.16 muestra el error relativo entre el valor experimental y predicho de esta variable de respuesta. El menor valor obtenido en la experimentación de Y_1 fue de 2.38 a condiciones de operación de 5 h, tiempo de congelación de -40°C, presión de 0.2 mbar y tiempo de liofilización de 20 h. la diferencia entre el error relativo del valor experimental y predicho fue de -15.29%.

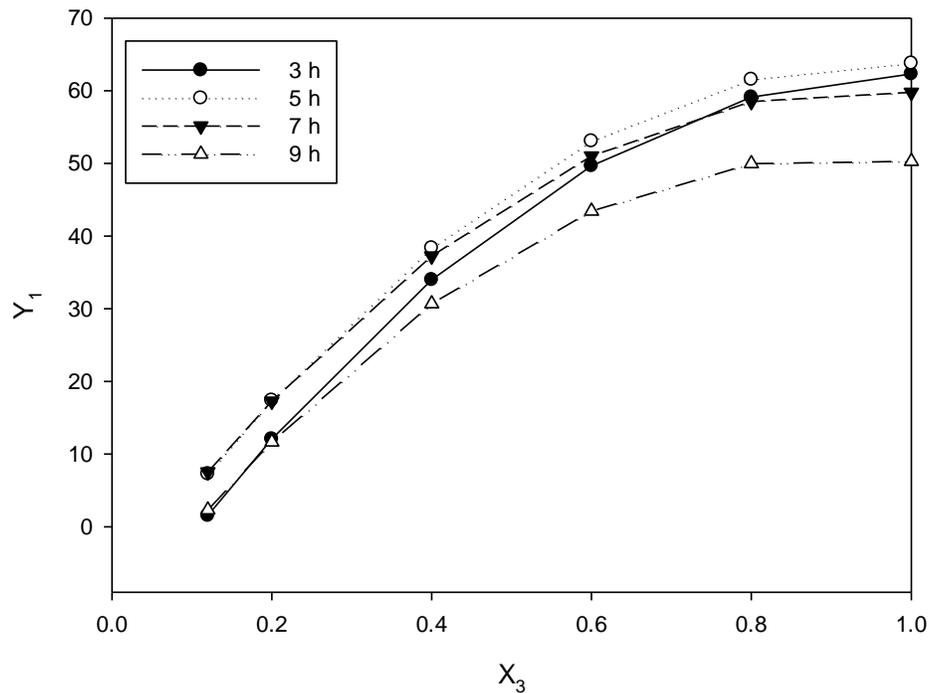


Figura 3.8 Contenido de humedad (% X) predicho a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión

3.5.1.3 Análisis estadístico de la actividad de agua

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza de una sola vía para a_w se presentan en la Tabla 3.12, cómo se puede observar en el análisis de datos, la a_w es significativamente afectada por los cuatro niveles seleccionado para el tiempo de liofilización ($p < 0.1$ y $F = 6.64924 > F_{crit} = 2.605525$ y $p = 0.00163 < 0.05$ y $F = 6.64924 > F_{crit} 3.490295$). Esto es, consistente con los hallazgos reportados que durante la liofilización, se obtienen valores de actividad de agua extremadamente bajos con el comportamiento de sorción de equilibrio para materiales sólidos en contacto con gas húmedo y el agua libre se congela y las bajas temperaturas de secado evitan la degradación enzimática y térmica (Searles et al., 2017; Acar et al., 2011).

Tabla 3.12 Análisis de varianza de la variable de respuesta a_w

Análisis de datos para a_w	Factores			
	X_1	X_2	X_3	X_4
K_1	0.529	0.977	0.478	3.114
K_2	1.725	1.430	1.315	1.254
K_3	1.424	1.295	1.716	0.511
K_4	1.712	1.687	1.880	0.511
R	1.196	0.711	1.402	2.603
F	0.60391	0.15021	0.77428	6.64924
p Value	0.62489	0.92756	0.53045	0.00678

3.5.1.4 Modelo matemático para predecir la actividad de agua

El modelo matemático de segundo orden para la predicción de la a_w , fue realizado en base a la ecuación 2.1, y mediante el análisis de regresión múltiple de los resultados de los experimentos ortogonales $L_{16}4^4$ y el uso de software Minitab 18.0. en la Ecuación 3.2 se presenta este modelo codificado:

$$Y_2 = 0.246 + 0.033X_1 - 0.098X_2 + 0.319X_3 - 0.3560X_4 - 0.0074X_1^2 + 0.0405X_1X_2 + 0.0441X_1X_3 - 0.0640X_1X_4 + 0.0307X_2^2 - 0.0321X_2X_4 - 0.0260X_3^2 - 0.0692X_3X_4 + 0.1162X_4^2 \quad 3.2$$

La R^2 para la Ecuación 3.2 fue 0.9979. El coeficiente X_2 (0.3560) indica que el tiempo de liofilización tiene el papel más importante al afectar la actividad del agua del producto final. Los resultados experimentales (Exp-R) y los resultados predichos (Pre-R) para esta variable de respuesta se presentan en la Tabla 3.16. En esta tabla se puede observar que el menor valor obtenido de humedad en los valores predichos fue de 0.087 en el experimento 15, con un % de error respecto al valor experimental (0.107) de 18.60%.

En base a la Ecuación 3.2. fue obtenida para Y_2 la relación entre el tiempo de congelación y la presión, considerando una temperatura de congelación y tiempo de liofilización de -20 °C y 5 h esto en la Figura 3.9, como se puede observar esta variable de respuesta disminuyó a casi cero, con valores de presión bajo y tiempo de congelación de 3 h, manteniendo los otros dos factores constantes.

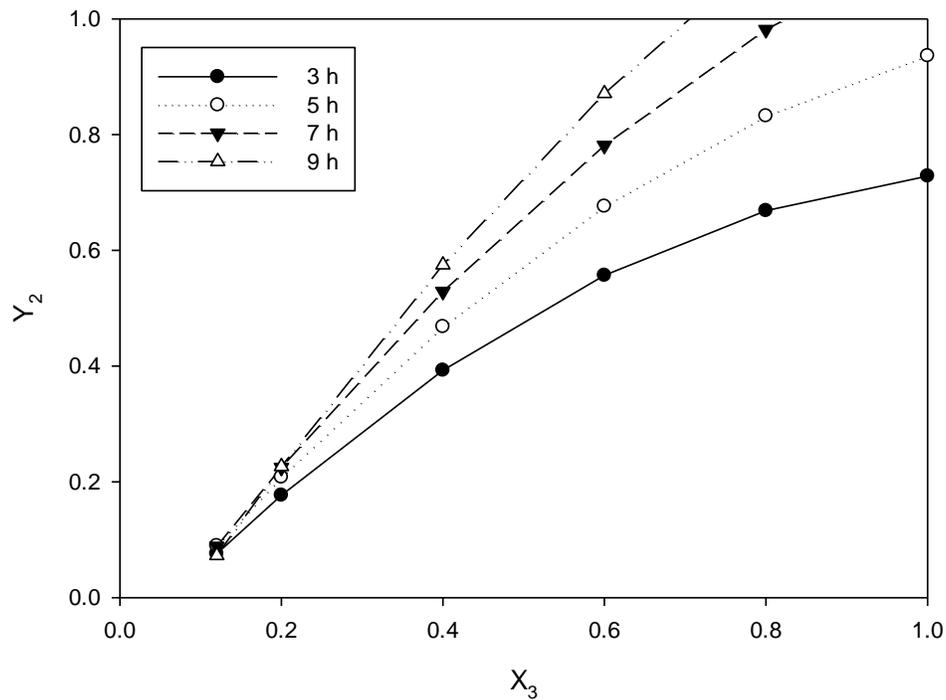


Figura 3.9 a_w predicho a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión

3.5.2 Parámetros de color (L , a y b) en la microbiota de Kéfir liofilizada

El color es el primer criterio y principal atributo de calidad en los alimentos secos, porque su cambio indica que ciertos componentes del producto pueden haberse deteriorado (Chua, et al., 2000; Lewicki & Duszczuk, 1998). En la Tabla 3.13 se presentan los resultados de las variables de respuesta Y_3 , Y_4 y Y_5 correspondientes a los parámetros de color (L , a y b) y aunque este valor no refleja un valor nutricional, si es una característica por considerar ya que, puede determinar la aceptabilidad del producto por parte del consumidor en adición su éxito o fracaso en el mercado.

Tabla 3.13 Valores experimentales para los parámetros de color L , a y b

Exp. No.	X_1 Tc (h)	X_2 Tc (°C)	X_3 P (mbar)	X_4 tl (h)	Y_3 L	Y_4 a	Y_5 b
1	1	1	1	1	44.02	-1.13	6.40
2	1	2	2	2	38.42	-0.98	5.58
3	1	3	3	3	39.96	-1.12	6.43
4	1	4	4	4	50.58	-1.44	7.49
5	2	1	2	3	36.73	-1.34	4.85
6	2	2	1	4	42.30	-1.45	6.79
7	2	3	4	1	39.11	-1.43	5.76
8	2	4	3	2	42.60	-1.30	5.71
9	3	1	3	4	38.65	-0.91	5.53
10	3	2	4	3	35.46	-1.08	4.80
11	3	3	1	2	44.60	-1.11	6.61
12	3	4	2	1	37.98	-1.51	5.57
13	4	1	4	2	49.33	-1.52	7.93
14	4	2	3	1	41.17	-1.17	6.78
15	4	3	2	4	42.62	-1.42	5.78
16	4	4	1	3	38.92	-1.09	5.16

De la Tabla 3.13 se puede observar que el valor de L aumento ligeramente en valores de 35.46 a 50.58, aumentando con ello la luminosidad de la microbiota liofilizada. El parámetro a resulto en valores de -0.91 a -1.52, lo que significa que dependiendo de las condiciones de la liofilización existiera un cambio de color entre la microbiota antes de ser sometida al proceso de secado, manteniéndose en tonalidades verdes; sin embargo, esta diferencia en la cromaticidad (a) no puede ser distinguida por el ojo humano. Con respecto al parámetro b presento un incremento con valores de 4.80 a 7.93, por lo que hubo un incremento en la tonalidad amarilla.

3.5.2.1 Análisis estadístico del contenido de los parámetros de color

En la Tabla 3.14 se presenta el análisis de varianza para los parámetros de color L , a y b . cómo se puede observar los factores no fueron estadísticamente significativos ($p < 0,1$ y $F > F_{crit} = 2,605525$, y $p < 0,05$ y $F > F_{crit} = 3,490295$) para ninguna de estas variables de respuesta. El efecto se ve en R' . Entre mayor sea R' más significativos serán los efectos. De la Tabla 3.10 se observar que el tiempo de liofilización afecta la luminosidad (L), mientras

que Croma (*a*) se ve afectado principalmente por la presión. Sin embargo, Croma (*b*) esta mayormente influenciado por el tiempo de la liofilización y la presión, contrario a otros resultados que reportan que los parámetros de color son afectados por el tiempo de congelamiento y el tiempo de secado (Messina et al., 2016).

Tabla 3.14 Análisis de varianza de los parámetros de color (*L*, *a*, *b*)

Análisis de datos para <i>L</i> , <i>a</i> y <i>b</i>		Factores			
		<i>X</i> ₁	<i>X</i> ₂	<i>X</i> ₃	<i>X</i> ₄
<i>L</i> [*]	<i>K</i> _{L1}	172.98	168.72	169.84	162.28
	<i>K</i> _{L2}	160.74	157.35	155.75	174.95
	<i>K</i> _{L3}	156.69	166.28	162.37	151.07
	<i>K</i> _{L4}	172.04	170.08	174.47	174.15
	<i>R'</i> _L	16.29	12.73	18.72	23.08
	<i>F</i>	0.91679	0.40606	0.94622	2.23689
	<i>p</i> Value	0.46201	0.75143	0.44902	0.13646
<i>a</i> [*]	<i>K</i> _{a1}	-4.67	-4.90	-4.78	-5.24
	<i>K</i> _{a2}	-5.52	-4.68	-5.25	-4.91
	<i>K</i> _{a3}	-4.61	-5.08	-4.50	-4.63
	<i>K</i> _{a4}	-5.20	-5.34	-5.47	-5.22
	<i>R'</i> _a	0.91	0.66	0.97	0.61
	<i>F</i>	1.28314	0.44649	1.30616	0.48155
	<i>p</i> Value	0.32468	0.72427	0.31764	0.70120
<i>b</i> [*]	<i>K</i> _{b1}	25.90	24.71	24.96	24.51
	<i>K</i> _{b2}	23.11	23.95	21.84	25.83
	<i>K</i> _{b3}	22.51	24.64	24.45	21.24
	<i>K</i> _{b4}	25.71	23.93	25.97	25.65
	<i>R'</i> _b	3.39	0.78	4.13	4.59
	<i>F</i>	0.94204	0.04580	0.96255	1.57480
	<i>p</i> Value	0.45084	0.98634	0.44197	0.24680

3.5.4 Diferencia de color

El color es un concepto que dependerá del observador y de las condiciones en que se observa el color. Es una característica que se puede medir en términos de intensidad y longitud de onda. Esta característica solo se hará visible cuando la luz de una fuente luminosa ilumina o incide en la superficie, por lo que la diferencia de color (ΔE) de un producto deshidratado con respecto al original no siempre puede ser siempre visto por el ojo humano, por este motivo las técnicas y métodos de análisis implican contar con un estándar de referencia comparado con la muestra en condiciones de iluminación idénticas (Sahin & Gülüm, 2006). Para el análisis de esta variable de respuesta Y_6 se consideró un estándar de referencia (muestra fresca de la microbiota de Kéfir) con valores de referencia: $L=35.28$, $a=-1.15$ y $b=2.84$, comparándolos con los del producto final obtenido. Dichos resultados se presentan en la Tabla 3.15. Estos valores muestran que la mayor ΔE se encuentra en el experimento 11 con un valor de 22.17 y corresponde a condiciones de experimentación de 7 horas de congelación, temperatura de -60°C , presión de 0.6 mbar y 10 horas de tiempo de liofilización. Así mismo, se observa que la menor diferencia es en el experimento 15; el cual, fue realizado a un tiempo de congelación de 9 horas, temperatura de congelación de -60°C , presión de 0.4 mbar y tiempo de liofilización de 20 horas.

Tabla 3.15 Valores experimentales para ΔE

Exp. No.	X_1 tc (h)	X_2 Tc ($^\circ\text{C}$)	X_3 P (mbar)	X_4 tl (h)	Y_6 ΔE
1	1	1	1	1	15.50
2	1	2	2	2	6.23
3	1	3	3	3	7.92
4	1	4	4	4	10.55
5	2	1	2	3	3.93
6	2	2	1	4	10.98
7	2	3	4	1	7.92
8	2	4	3	2	8.95
9	3	1	3	4	12.74
10	3	2	4	3	7.13
11	3	3	1	2	22.17
12	3	4	2	1	9.34
13	4	1	4	2	15.60
14	4	2	3	1	8.80
15	4	3	2	4	3.80
16	4	4	1	3	8.27

3.5.4.1 Análisis estadístico de la diferencia de color

En la Tabla 3.16 se presenta el análisis de varianza de una sola vía a una probabilidad de 0.05 y 1. Los resultados revelan que la ΔE del producto final es afectado significativamente por la presión ($p = 0.07176 < 0.1$ y $F = 3.01767 > F_{crit} = 2.605525$), contrario a los otros variables de entrada que no tuvieron un efecto significativo ($p < 0.1$ and $F > F_{crit} = 2.605525$, y at $p < 0.05$ y $F > F_{crit} = 3.490295$) sobre esta variable de respuesta, a diferencia de lo reportado por Messina et al. (2016). que afirma que el color es afectado por los tiempos de congelación y secado.

Tabla 3.16 Análisis de varianza de la variable de respuesta ΔE

Análisis de datos para ΔE		Factores			
		X_1	X_2	X_3	X_4
ΔE	$K_{\Delta E1}$	40.20	47.77	56.92	41.56
	$K_{\Delta E2}$	31.78	33.14	23.30	52.95
	$K_{\Delta E3}$	51.38	41.80	38.41	27.25
	$K_{\Delta E4}$	36.47	37.11	41.20	38.07
	$R'_{\Delta E}$	19.61	14.63	33.62	25.71
	F	0.75283	0.39523	3.01767	1.36381
	p Value	0.54157	0.75880	0.07176	0.30074

3.5.4.2 Modelo matemático para predecir la diferencia de color

A partir de la ecuación 2.1 de segundo orden se presenta el modelo matemático codificado para esta variable de respuesta:

$$Y_6 = 16.2 + 11.02X_1 + 18.15X_2 - 21.51X_3 - 7.27X_4 + 0.61X_1^2 - 5.77X_1X_2 - 1.23X_1X_3 + 1.590X_1X_4 - 0.257X_2^2 - 0.07X_2X_3 - 1.45X_2X_4 + 3.0X_3^2 + 1.754X_3X_4 \quad 3.3$$

La R^2 obtenida para esta ecuación fue 0.9666. Los resultados de los datos predichos para esta variable de respuesta se presentan en la Tabla 3.21 en donde se presentan los datos experimentales (Exp-R) y resultados predichos (Pre-R) de la microbiota de Kéfir liofilizada. En esta tabla se puede observar que la menor diferencia de color en los valores predichos fue de 4.65 en el experimento 15, con un % de error respecto al valor experimental (3.80) de -22.64%.

La Figura 3.10 muestra la relación entre la diferencia de color (ΔE), el tiempo de congelación y la presión a una temperatura de congelación de -20 °C y un tiempo de liofilización de 5 h.

Al mismo tiempo se puede notar que, la diferencia de color prevista disminuye con el aumento de la presión hasta una presión de 0,6 mbar, y permanece constante hasta una presión de 0,8. El mínimo ΔE se obtiene con tiempo de congelación a partir de 3 h. El coeficiente de presión, 21,51, indica que la presión juega el papel más importante en afectar la diferencia de color de la microbiota de Kéfir liofilizada.

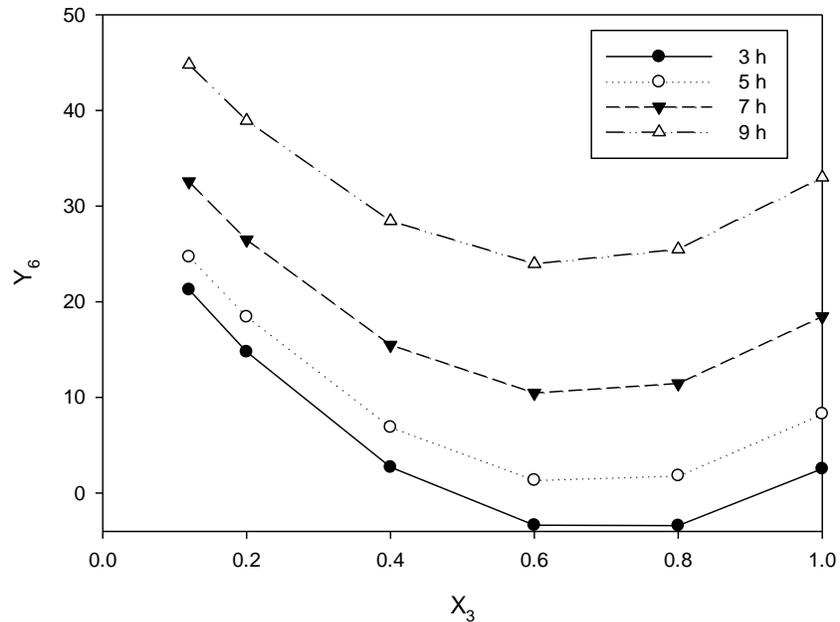


Figura 3.10 ΔE predicho a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión

De La Tabla 3.21 se puede ver que el valor más bajo obtenido para ΔE fue de 3.80 (Experimento 15) a un tiempo de congelación de 9 h, temperatura de congelación de -60°C , presión de 0.4 mbar y tiempo de liofilización de 20 h. la máxima diferencia de color fue de 22.17 en el experimento 11. La Figura 3.11 presenta las imágenes comparativas de color de la microbiota fresca antes del secado y el cambio de color mínimo y máximo después de ser liofilizada.

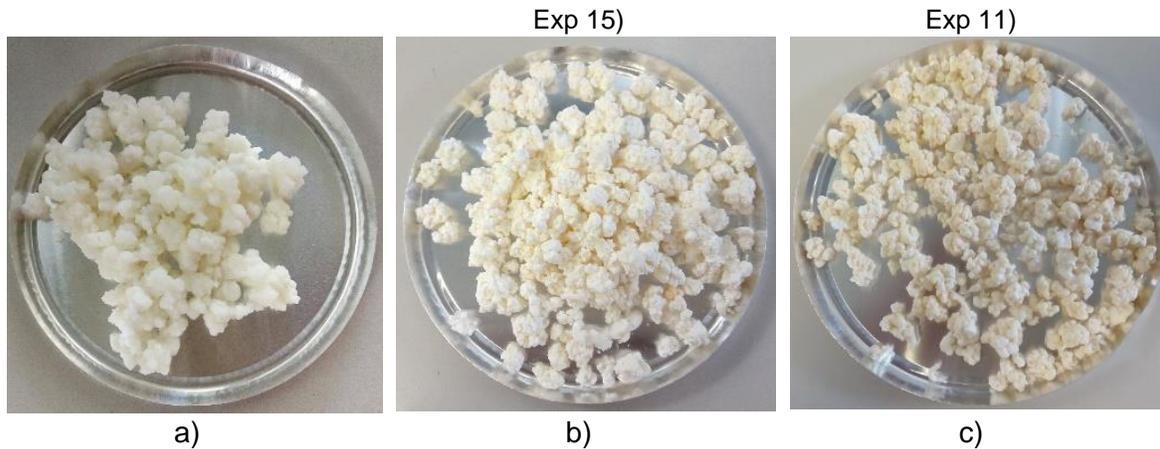


Figura 3.11 Muestra de color de la microbiota de Kéfir: (a) fresca, y liofilizada (b) Experimento 15 (menor diferencia de color), y (c) Experimento 11 (máxima diferencia de color)

3.5.3 Bacterias ácido-lácticas

Uno de los primeros requisitos para que un alimento sea considerado como probiótico; es que, debe contener al menos en su composición 10^6 UFC/g (6 log UFC/g) aunque algunos autores como Vinderola & Reinheimer (2000) han sugerido recuentos superiores a 8 log (UFC/g) para asegurar los efectos probióticos al momento de su ingesta. Por lo que un proceso de secado adecuado es necesario para evitar el daño bacteriano y muerto para así también alcanzar la tasa de supervivencia requerida después de la liofilización (Quintana et al., 2017). En la Tabla 3.17 se presentan los resultados para la variable de respuesta Y_7 : supervivencia de las bacterias ácido lácticas en la microbiota de Kéfir liofilizada, valores representados en ciclos logarítmicos, observándose un menor crecimiento en el experimento 4 al obtener 4.61 Log (UFC/g), dicho experimento fue realizado a una temperatura de -20°C , tiempo de congelación de 9 h, presión 0.8 mbar y un tiempo de liofilización de 20 h. Y obteniendo un valor máximo de supervivencia en el experimento 9 con un valor de 8.64 Log (UFC/g), mismo que fue obtenido bajo condiciones de experimentación de -60°C , 3 h de congelamiento, 0.6 mbar de presión y 20 h de tiempo de liofilización.

Tabla 3.17 Valores experimentales para las UFC/g de Bacterias ácido lácticas

Exp No.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₇
	Tc (h)	Tc (°C)	P (mbar)	TI (h)	Log UFC/g BAL
1	1	1	1	1	4.99
2	1	2	2	2	8.03
3	1	3	3	3	8.56
4	1	4	4	4	4.61
5	2	1	2	3	6.81
6	2	2	1	4	8.20
7	2	3	4	1	8.35
8	2	4	3	2	8.42
9	3	1	3	4	8.64
10	3	2	4	3	6.49
11	3	3	1	2	6.59
12	3	4	2	1	8.48
13	4	1	4	2	7.13
14	4	2	3	1	7.54
15	4	3	2	4	5.04
16	4	4	1	3	7.90

3.5.3.1 Análisis estadístico del contenido de bacterias ácido-lácticas

En la Tabla 3.18 se presentan los resultados del análisis de varianza de una sola vía de esta variable de respuesta, en donde se puede observar que la influencia de los cuatro factores no es significativa ($p > 0.1$ y $F < F_{crit} = 2.605525$ tampoco $p > 0.05$ y $F < F_{crit} = 3.490295$); no obstante, el efecto significativo es visto en el rango máximo de (6.57) que corresponde a la presión, por otra parte el rango (5.60) del tiempo de congelamiento fue el más grande de los rangos restantes. Esto muestra que tanto la presión como el tiempo de congelamiento tienen un rol importante en esta variable de respuesta.

Tabla 3.18 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de BAL

Análisis de datos para el log de (UFC/g) de BAL	Factores			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
K ₁	26.19	27.57	27.67	29.37
K ₂	31.79	30.27	28.36	30.17
K ₃	30.20	28.54	33.16	29.76
K ₄	27.61	29.40	26.59	26.48

<i>R'</i>	5.60	2.69	6.57	3.69
<i>F</i>	0.81998	0.14854	1.16898	0.32509
<i>p</i> Value	0.50748	0.92864	0.36213	0.80726

3.5.3.2 Modelo matemático del contenido de bacterias ácido-lácticas

El modelo matemático de segundo orden codificado, para la predicción de la supervivencia de las bacterias ácido-lácticas después del secado es dada por la Ecuación 3.4:

$$Y_7 = 0.06 - 2.88X_1 + 3.09X_2 + 2.332X_3 + 3.52X_4 + 0.504X_1^2 - 0.157X_1X_4 + 0.103X_2^2 - 3.40.510X_2X_3 - 0.907X_2X_4 - 0.433X_3X_4 \quad 3.4$$

En esta ecuación la R_2 obtenida fue 0.8851. En la Tabla 3.21 se muestra los resultados experimentales y predichos del contenido de bacterias ácido lácticas de la microbiota de Kéfir liofilizada. El valor más alto fue de 8.64 log (UFC/g), menos de 0,5 ciclos logarítmicos de la muestra fresca antes del secado (9.05 log (UFC/g)) Esto se obtuvo con un tiempo de congelación de 7 h, una temperatura de congelación de - 20 °C, una presión de 0,6 mbar y un tiempo de liofilización de 20 h. La diferencia relativa de error entre el log experimental y el logaritmo predicho fue del 7,56%. La liofilización tuvo un efecto negativo sobre la tasa de supervivencia del 4,53%. Este resultado es diferente de otros investigadores que reportaron un efecto negativo del 7% sobre la viabilidad de la BL sin el uso de crioprotectores durante el proceso de liofilización (N'Guessan et al., 2016; Capela et al., 2006; Abadias et al., 2001)

El valor predico de bacterias ácido-lácticas se presenta en la Figura 3.12, considerando diferentes niveles de presión y tiempo de congelamiento, manteniendo constante los otros dos factores. La Figura muestra que las BAL incrementan con el aumento de la presión y con niveles bajos de tiempo de congelación. El valor máximo de supervivencia se obtuvo para una presión de 1 mbar y tiempo de congelamiento de 3 h, con presiones superiores la supervivencia de las BAL incrementa más de dos ciclos logarítmicos.

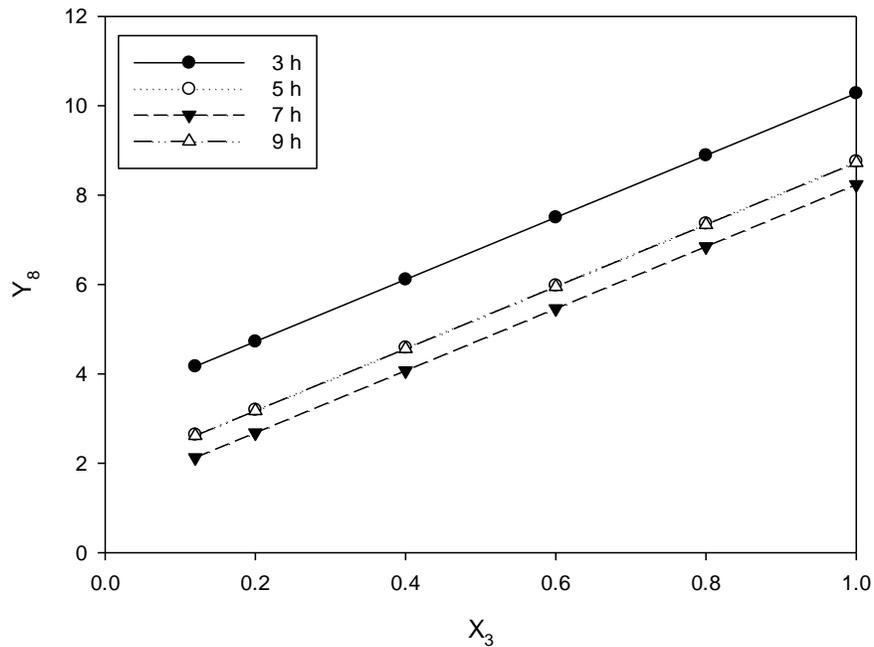


Figura 3.12 Valor predicho de log (UFC/g) de BAL a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión

3.5.4 Levaduras en la microbiota de Kéfir liofilizada

En la Tabla 3.19 se puede observar los resultados experimentales para la variable de respuesta Y_8 : supervivencia de levaduras en la microbiota de Kéfir liofilizada, representadas en ciclos logarítmicos. Los resultados señalan un menor crecimiento en el experimento 13 al obtener 4.29 Log (UFC/g), dicho experimento fue realizado a una temperatura de -80°C , tiempo de congelación de 3 h, presión 0.8 mbar y un tiempo de liofilización de 10 h. Y obteniendo un valor máximo de supervivencia en el experimento 9 con un valor de 8.68 Log (UFC/g), mismo que fue obtenido bajo condiciones de experimentación de -40°C , 9 h de congelamiento, 0.6 mbar de presión y 10 h de tiempo de liofilización.

Tabla 3.19 Valores experimentales para las UFC/g de Levaduras

Exp. No.	X ₁ tc (h)	X ₂ Tc (°C)	X ₃ P (mbar)	X ₄ tl (h)	Y ₈ Log UFC/g Levaduras
1	1	1	1	1	5.22
2	1	2	2	2	5.63
3	1	3	3	3	8.67
4	1	4	4	4	5.44
5	2	1	2	3	8.44
6	2	2	1	4	8.27
7	2	3	4	1	8.40
8	2	4	3	2	8.68
9	3	1	3	4	8.67
10	3	2	4	3	6.20
11	3	3	1	2	7.43
12	3	4	2	1	8.48
13	4	1	4	2	4.29
14	4	2	3	1	8.14
15	4	3	2	4	5.95
16	4	4	1	3	8.02

3.5.4.1 Análisis estadístico del contenido de bacterias ácido-lácticas

En la Tabla 3.20 se presenta el análisis de varianza de una sola vía de esta variable de respuesta, este análisis muestra que no existe una influencia de ninguno de los factores analizados es significativa ($p > 0.1$ y $F < F_{crit} = 2.605525$ tampoco $p > 0.05$ and $F < F_{crit} = 3.490295$) sin embargo, el cambio es visto en el rango máximo R', donde la supervivencia de las levaduras es afectada por la presión (9.83) y el tiempo de congelación (8.83) Esto demuestra que la presión y el tiempo de congelación son factores importantes en la supervivencia de las levaduras contenidas en la microbiota de Kéfir liofilizada.

Tabla 3.20 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de Levaduras

Análisis de datos para el log (UFC/g) de levaduras	Factores			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
K ₁	24.97	26.63	28.94	25.02
K ₂	33.79	28.25	28.51	21.75
K ₃	30.78	30.46	34.16	31.48
K ₄	26.40	30.61	24.33	28.33
R'	8.83	3.98	9.83	6.58
F	2.23175	0.34546	2.19270	0.53571
p Value	0.13706	0.79307	0.14177	0.66659

3.5.4.2 Modelo matemático del contenido de levaduras

El modelo matemático de segundo orden es dado por la ecuación 3, para esta variable de respuesta:

$$Y_8 = 2.52 + 3.35X_1 - 0.71X_2 + 3.90X_3 + 2.57X_4 - 0.32X_1^2 + 2.77X_1X_2 - 0.656X_1X_3 - 0.348X_1X_4 + 0.080X_2^2 + 0.150X_2X_3 - 0.42X_2X_4 - 0.375X_3^2 - 0.343X_3X_4 \quad 3.5$$

El coeficiente de correlación obtenido (R^2) para esta ecuación fue 0.8017. Los resultados de los datos predichos para esta variable de respuesta se presentan en la Tabla 3.16. El valor máximo de 8.67 log (UFC/g) para las levaduras es inferior a 0,5 ciclos logarítmicos de la muestra fresca antes del secado (8,90 log (UFC/g) de levaduras). Esto se obtuvo con tiempos de congelación de 3 a 7 h, temperaturas de congelación de -20 a -60 °C, presión de 0,6 mbar y tiempo de liofilización de 15 a 20 h. Las diferencias de error relativas entre el log experimental y el log predicho (CFU/g) de las levaduras fueron de 14.24 y 7.36% para las pruebas No. 3 y 9, respectivamente. La liofilización tuvo un efecto negativo en la tasa de supervivencia del 2.60%; este resultado es similar al reportado en otros estudios, que también reportaron un efecto negativo, incluso con el uso de crioprotectores (N'Guessan et al., 2016; Capela et al., 2006; Abadias et al., 2001). En esta tabla se puede observar que el mayor valor obtenido en los valores predichos para esta variable de respuesta fue de 9.14 en el experimento 12, con un % de error respecto al valor experimental (8.48) de -7.77%.

La Figura 3.13 muestra que la máxima supervivencia predicha en levaduras se alcanza cuando la presión aumenta a 0.8 mbar con una temperatura de congelación de 3 h. Con niveles superiores a los 0.8 mbar y tiempos de congelación superiores a 3 h, la supervivencia de la levadura disminuye más de dos ciclos logarítmicos.

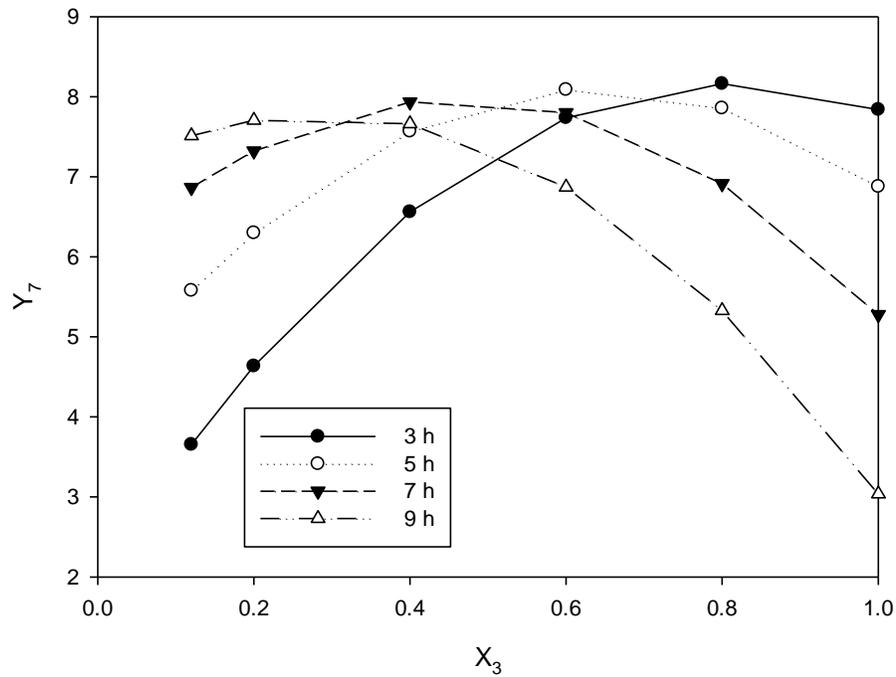


Figura 3.13 Valor predicho de log (UFC/g) de Levaduras a diferentes niveles de tiempo de congelación y presión

Tabla 3.21 Datos experimentales (Exp-R) y resultados predichos (Pre-R) de la microbiota de Kéfir liofilizada

Exp. No.	Factores																	
	% Humedad			Actividad de agua (a_w)			Diferencia de color (CD)						Log (UFC/g) de BAL			Log (UFC/g) de Levaduras		
	Exp-R	Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)	Exp-R				Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)
							L^*	a^*	b^*	ΔE								
1	11.84	12.08	-2.02	0.173	0.177	-2.2	44.02	-1.13	6.4	15.5	14.77	4.73	4.99	4.72	5.37	5.22	4.64	11.24
2	4.84	5.5	-13.55	0.111	0.121	-9.19	38.42	-0.98	5.58	6.23	7.66	-22.92	8.03	8.27	-2.94	5.63	6.94	-23.24
3	3.08	2.51	18.47	0.114	0.105	8.07	39.96	-1.12	6.43	7.92	6.5	17.89	8.56	8.32	2.85	8.67	7.44	14.24
4	3.25	3.12	3.88	0.131	0.128	2.6	50.58	-1.44	7.49	10.55	11.3	-7.13	4.61	4.87	-5.68	5.44	6.11	-12.42
5	4.84	3.23	33.24	0.111	0.089	20	36.73	-1.34	4.85	3.93	4.86	-23.59	6.81	7.45	-9.43	8.44	9.1	-7.81
6	2.38	2.74	-15.29	0.137	0.142	-3.65	42.3	-1.45	6.79	10.98	10.82	1.48	8.2	8.06	1.76	8.27	8.19	1.03
7	65.33	65.08	0.38	0.983	0.98	0.35	39.11	-1.43	5.76	7.92	8.05	-1.68	8.35	8.47	-1.49	8.4	8.55	-1.71
8	26.85	28.56	-6.35	0.494	0.518	-4.86	42.6	-1.3	5.71	8.95	8	10.59	8.42	7.76	7.86	8.68	8.08	6.94
9	2.94	4.64	-57.86	0.136	0.161	-18.31	38.65	-0.91	5.53	12.74	11.77	7.61	8.64	7.99	7.56	8.67	8.03	7.36
10	3.95	4.36	-10.43	0.21	0.216	-2.95	35.46	-1.08	4.8	7.13	6.89	3.37	6.49	6.31	2.85	6.2	6.08	1.92
11	3.45	3.18	7.91	0.092	0.088	4.02	44.6	-1.11	6.61	22.17	22.36	-0.83	6.59	6.75	-2.35	7.43	7.59	-2.04
12	60.43	58.85	2.62	0.986	0.964	2.27	37.98	-1.51	5.57	9.34	10.25	-9.7	8.48	9.1	-7.35	8.48	9.14	-7.77
13	10.93	9.86	9.74	0.557	0.543	2.53	49.33	-1.52	7.93	15.6	16.17	-3.62	7.13	7.59	-6.47	4.29	4.71	-9.82
14	51.09	52.64	-3.04	0.972	0.995	-2.37	41.17	-1.17	6.78	8.8	7.89	10.3	7.54	6.91	8.34	8.14	7.54	7.42
15	7.25	5.86	19.21	0.107	0.087	18.6	42.62	-1.42	5.84	3.8	4.65	-22.34	5.04	5.63	-11.61	5.95	6.55	-10.15
16	3.79	5.03	-32.72	0.076	0.093	-22.63	38.92	-1.09	5.16	8.27	7.63	7.74	7.9	7.4	6.37	8.02	7.6	5.22

3.6 Condiciones óptimas según Taguchi

Para determinar las condiciones óptimas de operación en el secado por liofilización de acuerdo a la metodología Taguchi, fueron consideradas para su optimización variables de respuesta como el % de humedad y a_w , debido a que estas variables afectan la vida útil del producto deshidratado, junto a su estabilidad microbiológica. Por otra parte, el contenido de microorganismos probióticos fue considerado como una variable de respuesta vital ya que; es quien otorga la funcionalidad del producto. Mediante la metodología Taguchi, el análisis de medias, la señal de ruido/objetivo de respuesta y el análisis de varianza fue determinado la contribución de cada factor sobre las variables de respuesta y a su vez, fue posible identificar que parámetros fueron los de mayor influencia, considerando los principales efectos de cada una de las variables de entrada o factores con respecto al objetivo de respuesta deseado como "lo más pequeño es mejor", "lo más grande es mejor" o "lo nominal es lo mejor". Para el caso de las variables de respuesta seleccionadas en la Tabla 3.22 se expone el objetivo de respuesta esperado.

Tabla 3.22 Variables de respuesta seleccionadas y el valor objetivo esperado

Variable de respuesta	Objetivo de respuesta
%X	Lo más pequeño es lo mejor
a_w	Lo más pequeño es lo mejor
Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas	Lo más grande es lo mejor
Log (UFC/g) de levaduras	Lo más grande es lo mejor

Una vez determinado el objetivo esperado y mediante el análisis de las gráficas de efectos principales para medias de datos y señal de ruido de cada una de las variables de salida (Figura 3.14, 3.15, 3.16, 3.17) se obtuvo el factor y nivel óptimo deseado.

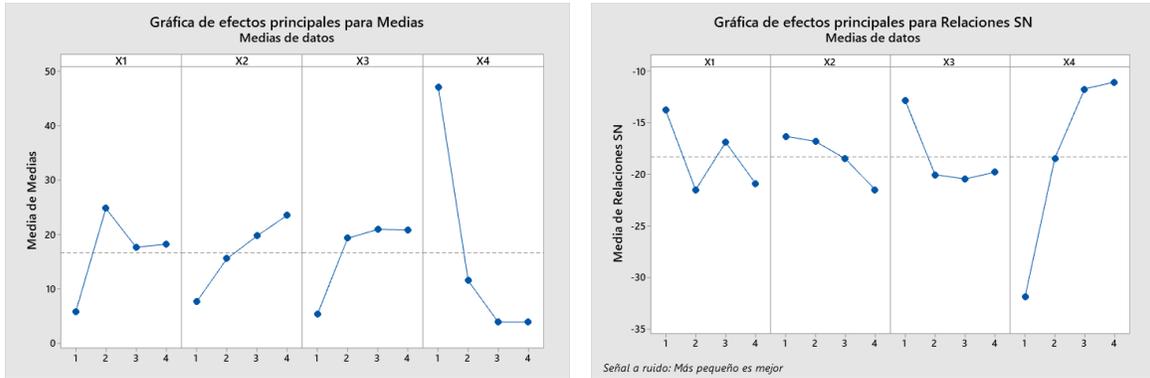


Figura 3.14 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el % de humedad

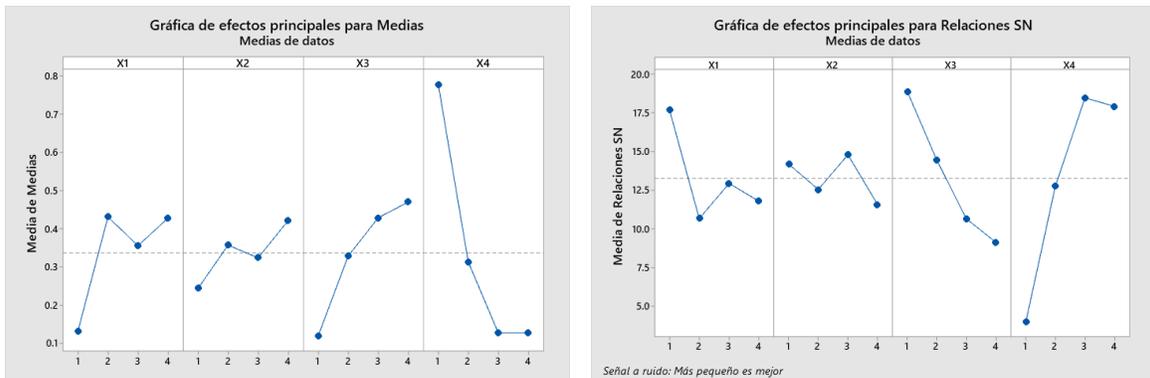


Figura 3.15 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para a_w

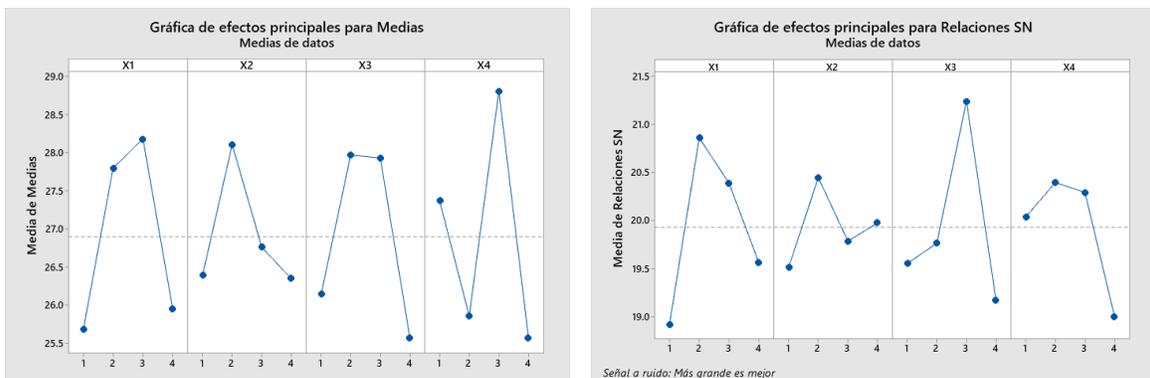


Figura 3.16 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas

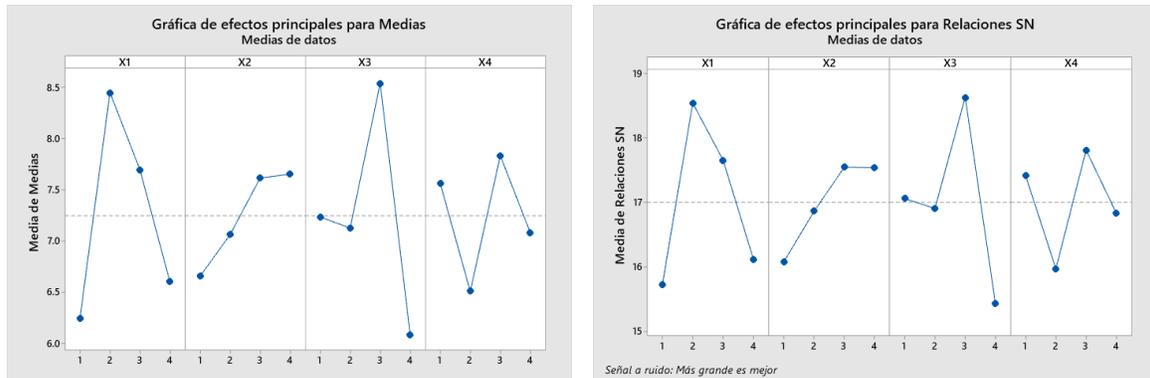


Figura 3.17 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de Levaduras

En base a los resultados para los valores objetivo Taguchi, propone condiciones de operación óptimas con el objetivo de obtener valores de % X por debajo de 6, a_w menores al 0.60, y al menos 10^6 unidades formadoras de colonias por gramo (6 UFC/g) de microorganismos probióticos. Estos niveles de operación seleccionados se presentan en la Tabla 3.23:

Tabla 3.23 Factores y niveles óptimos para la liofilización de la microbiota de Kéfir

Variable de respuesta	Factor			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
%X	Nivel 1			
a_w		Nivel 1		
Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas			Nivel 3	
Log (UFC/g) de levaduras				Nivel 3

Los niveles óptimos seleccionados para estos parámetros fueron: tiempo de congelación de 3 h, temperatura de congelación de -20 °C, presión de 0.6 mbar y tiempo de liofilización de 15 h.

3.6.1 Validación de las condiciones óptimas del proceso de secado por liofilización en la microbiota de Kéfir

Una vez obtenidos los parámetros de operación recomendados por el análisis Taguchi, se procedió a validar las condiciones propuestas bajo los factores y niveles recomendados en la Tabla 3.23, dando como resultado las variables de respuesta indicadas en la Tabla 3.24.

Tabla 3.24 Resultados de la validación experimental del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir

VARIABLES DE ENTRADA	PARÁMETROS	RESPUESTA
X ₁ : Tiempo de congelación: 3 h	% X	5.0%
X ₂ : Temperatura de congelación: -20°C	a _w	0.167
	ΔE	7.79
X ₃ : Presión: 0.6 mbar	Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas	8.5
X ₄ : Tiempo de liofilización: 15 h	Log (UFC/g) de levaduras	8.6

3.7 Almacenamiento de la microbiota de Kéfir liofilizada

La efectividad de los productos alimenticios que contienen probióticos, dependerá del número de células viables y activas por gramo o mililitro de los productos en el momento del consumo, pues sus beneficios solo pueden obtenerse cuando el producto contiene el mínimo viable, la industria alimentaria en general recomienda un mínimo de 10⁶ UFC/ml (o UFC/g) en el momento del consumo (Tripathi & Giri, 2014; Boylston et al., 2004). Por lo tanto, es esencial garantizar una alta tasa de supervivencia de los microorganismos probióticos durante la producción y el almacenamiento. Dadas las características de la microbiota de Kéfir; esta, tiene una vida de anaquel muy corta, además de la implícita dedicación para mantener el cultivo vivo y sin contaminación a lo largo del tiempo; por esta razón, el secado por liofilización fue empleado como una alternativa eficaz para preservarlo, evaluando sus características fisicoquímicas y microbiológica. Por lo que, bajo este escenario se evaluaron a lo largo del almacenamiento variables de respuesta como Y₁: % Humedad, Y₂: a_w, Y₃: Diferencia de color (ΔE), Y₄: Evolución del Peso (W), Y₅: log UFC/g

bacterias ácido lácticas, Y_6 : log UFC/g levaduras todo bajo las condiciones descritas en el diseño de experimentos 2.11.1.

3.7.1 Humedad

El contenido de humedad de un producto deshidratado debe mantenerse constante durante su vida útil y aunque el secado por liofilización puede brindar una estabilidad de los productos que contienen microorganismos, las condiciones de almacenamiento tienen un rol importante ya que el producto final debe almacenarse en el empaque y condiciones adecuadas; para el caso de la humedad contenida en el microbiota de Kéfir liofilizado se recomienda mantenerse en niveles inferiores al 10%, para evitar crecimiento de microorganismos no deseados, al tener menos agua disponible se reducirán las reacciones de deterioro (Domínguez et al., 2007). En la Figura 3.18 se muestra el contenido de humedad de la microbiota de Kéfir liofilizada de los 8 experimentos. Y en la Figura 3.19 muestran la evolución del contenido de humedad en función de las condiciones de almacenamiento: Temperatura: 26°C y 4°C; Tipo de empaque: polietileno y metalizado; Atmosfera: vacío y nitrógeno. En la Figura 3.18 se puede observar que los experimentos 5, 6, 7 y 8 mantuvieron una mayor estabilidad, permaneciendo dentro del límite permisible durante los 120 días de almacenamiento. Estos experimentos permanecieron durante el almacenamiento a una temperatura constante de 4°C.

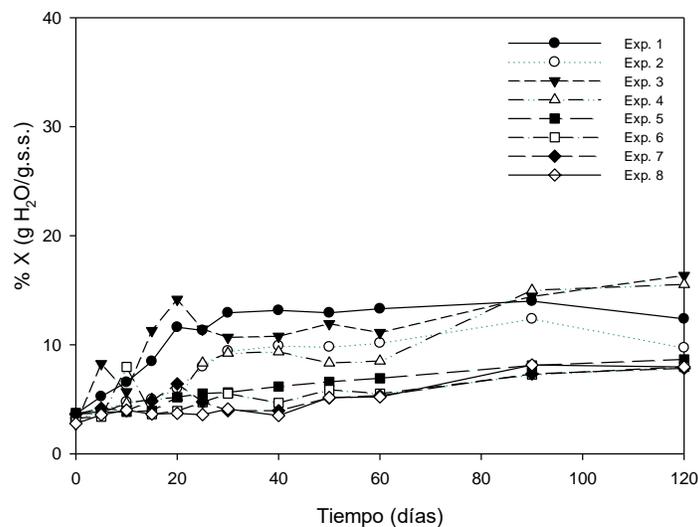


Figura 3.18 Evolución del contenido de humedad durante el almacenamiento

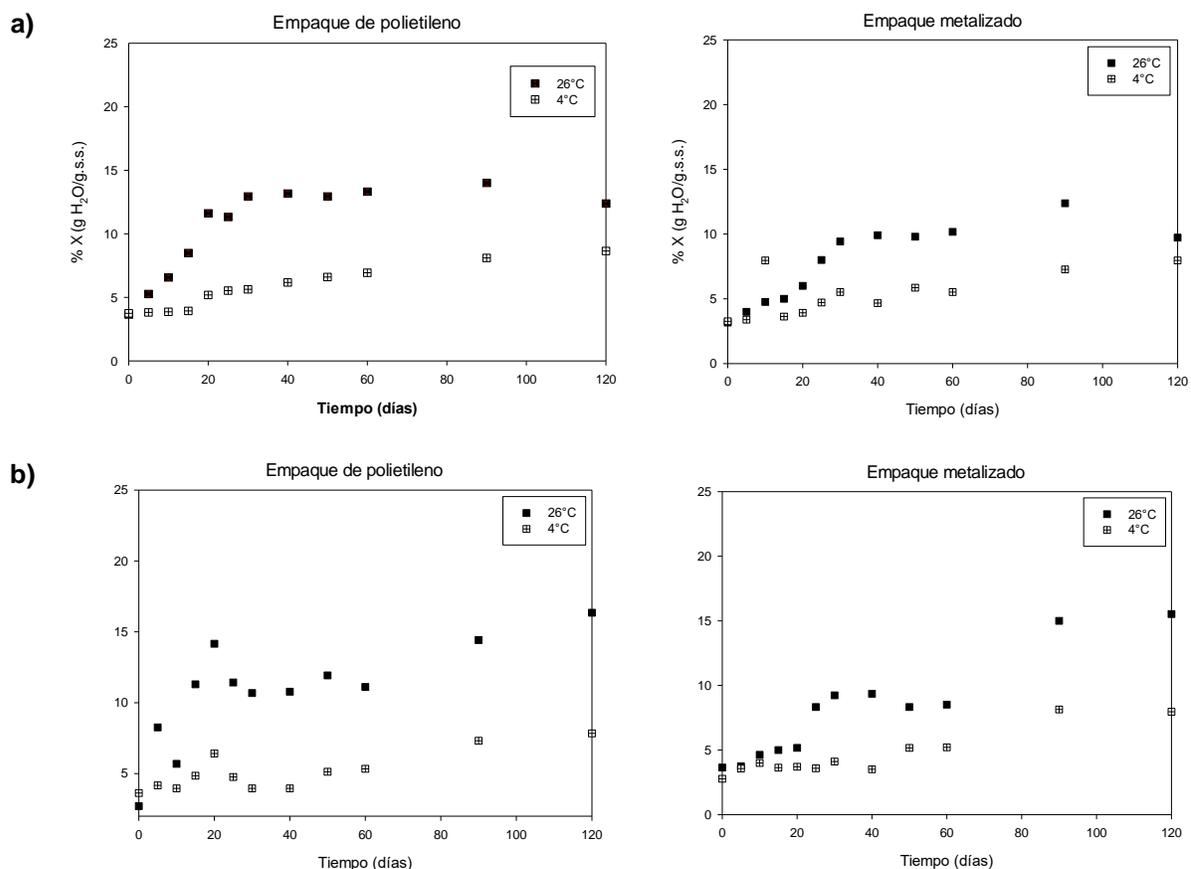


Figura 3.19 Evolución del contenido de humedad durante el almacenamiento: a) vacío y b) N_2

Como se puede observar en la Figura 3.18, el contenido de humedad fue menor en todos los experimentos, no importando el tipo de empaque o atmosfera, si no la temperatura de almacenamiento. Aunque el producto presente en todos los experimentos mayor estabilidad los primeros 20 días de almacenamiento, posterior a ello el incremento en esta variable de respuesta fue evidente, sobre todo en las muestras almacenadas a temperatura de 26°C . Los resultados obtenidos en los experimentos a temperatura de 26°C en los que; a lo largo del almacenamiento, el contenido de humedad incrementa puede ser atribuido a las condiciones atmosféricas y la humedad relativa del ambiente (Hymavathi & Khader, 2005) así como a la permeabilidad del empaque utilizado.

El análisis estadístico confirma lo anterior mediante el análisis de varianza ($\alpha=0.05$) presentado en la Tabla 3.25; en la cual se puede observar que, la temperatura tiene un efecto significativo sobre el contenido de humedad de la microbiota de Kéfir almacenada, teniendo la mayor contribución a las variaciones de esta variable de respuesta con 81%.

Contrario al tipo de atmosfera utilizada y tipo de empaque, los cuales no tienen un efecto significativo; no obstante, la contribución a la variación de los resultados por el tipo de empaque utilizado es del 11.4%. lo cual puede ser atribuible a la permeabilidad del mismo.

Tabla 3.25 Análisis de Varianza de la variable Y_1 (%contenido de humedad) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temp. (°C)	1	32.0000	32.0000	42.67	0.003
Atmósfera	1	0.0000	0.0000	0.00	1.000
Empaque	1	4.5000	4.5000	6.00	0.070
Error	4	3.0000	0.7500		
Total	7	39.5000			

3.7.2 Actividad de agua

En la Figura 3.20 se presenta el contenido de humedad de la microbiota de Kéfir liofilizada de los 8 experimentos y en la Figura 3.21 se muestra la evolución del contenido de humedad en función de las condiciones de almacenamiento: Temperatura: 26°C y 4°C; Tipo de empaque: polietileno y metalizado; Atmosfera: vacío y nitrógeno. Como se puede observar en la Figura 3.20, la a_w tuvo un incremento significativo en todos los experimentos, hasta el día 40 que presentó una estabilidad aparente, excepto el experimento 7 que tuvo una disminución de esta variable de respuesta y corresponde a condiciones de temperatura de almacenamiento: 4°C; Empaque: polietileno y atmosfera: N₂. Los valores menores obtenidos fueron los experimentos mantenidos a temperaturas de 4°C, presentando estos experimentos un incremento los primeros 60 días y una disminución de esta variable de respuesta durante el tiempo restante de almacenamiento. En la Figura 3.20 se puede observar el incremento de la a_w durante todo el almacenamiento en el empaque de polietileno, similar al empaque metalizado ambos a temperatura de 26°C, los valores menores a 0.5 de a_w fueron obtenidos a temperaturas de 4°C. siendo el menor valor de a_w al final del almacenamiento de 0.39, en el empaque de polietileno a 4°C y atmosfera de nitrógeno, recordando que a valores por debajo de 0.6 de a_w los alimentos presentan una estabilidad microbiológica, evitando el crecimiento de microorganismos indeseables. Autores como Kök Taş (2015) reportan valores máximos a los 30 días de almacenamiento del Kéfir liofilizado de 0.235 a 4°C.

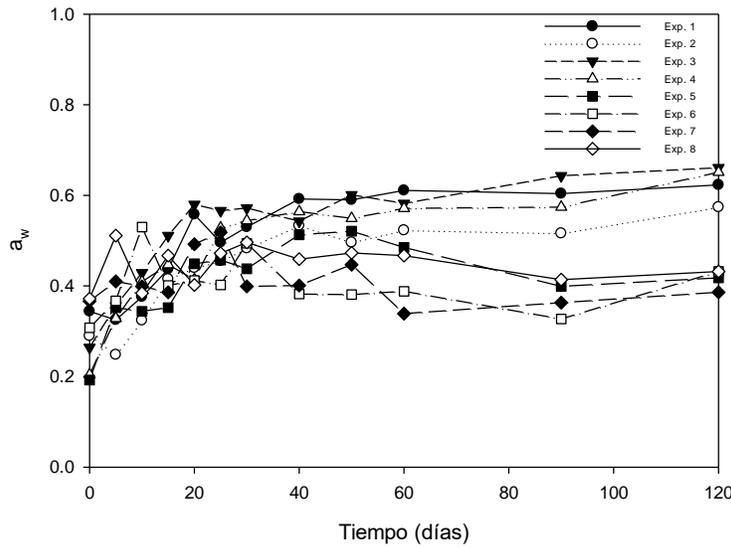


Figura 3.20 Evolución de la actividad de agua durante el almacenamiento

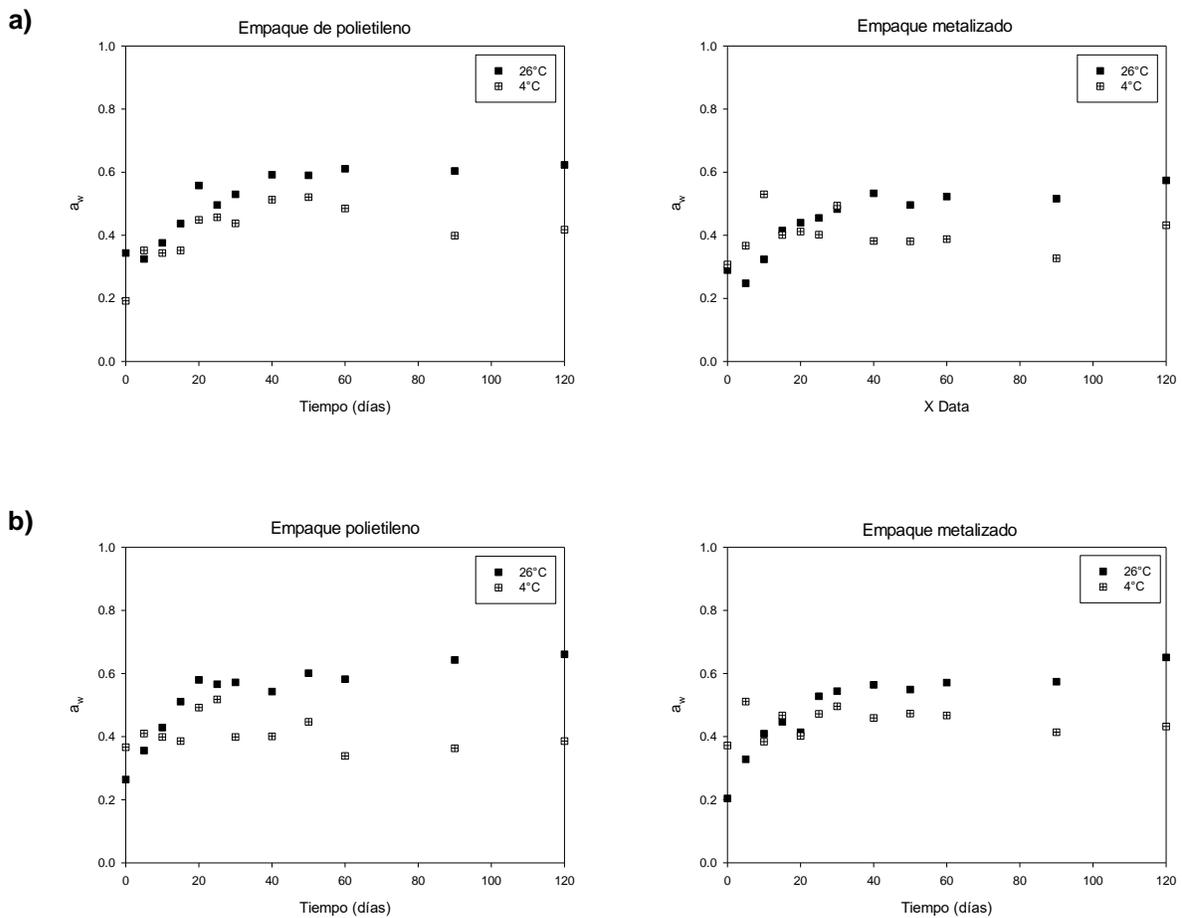


Figura 3.21 Evolución de la actividad de agua (a_w) durante el almacenamiento a) vacío y b) N_2

El análisis de varianza ($\alpha=0.05$) para esta variable de respuesta es presentado en la Tabla 3.26; en la cual se puede determinar que, la temperatura es la variable de entrada que tiene un efecto estadísticamente significativo a 95% de probabilidad sobre la a_w de la microbiota de Kéfir almacenada, teniendo la mayor contribución a las variaciones de esta variable de respuesta con un 63.4%. Factores como la atmosfera o el empaque no presentan un efecto estadísticamente significativo, contribuyendo en menor porcentaje a esta variación (9.1% y 6.1. respectivamente).

Tabla 3.26 Análisis de varianza de la variable Y_2 (a_w) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temp (°C)	1	0.010512	0.010512	11.85	0.026
Atmósfera	1	0.001512	0.001512	1.70	0.262
Empaque	1	0.001012	0.001012	1.14	0.346
Error	4	0.003550	0.000888		
Total	7	0.016588			

3.7.3 Diferencia de color

La Figura 3.22 muestra los resultados obtenidos en los 8 experimentos a lo largo del tiempo que duro la prueba de almacenamiento, como se puede observar la diferencia de color tuvo incrementos y decrementos a lo largo del tiempo, en donde el experimento 4 tuvo un comportamiento resaltante al obtener los mayores valores de diferencia de color (15 unidades) en el día 20, disminuyendo hasta 4 unidades al término del estudio, esto fue dado en condiciones de experimentación de temperatura:26°C; empaque: metalizado y atmosfera: nitrógeno, esto a diferencia del experimento 8 que lo único que vario fue la temperatura de almacenamiento a 4°C obteniendo el valor máximo de la diferencia de color de 6 unidades en el día 10; no obstante el valor final de la diferencia de color fue la misma al término del almacenamiento (4 unidades).

En la Figura 3.23 se puede observar en el inciso a) una estabilidad en la diferencia de color en el empaque de polietileno empacado al vacío en ambas temperaturas, obteniendo valores del ΔE al término del almacenamiento de 1 unidad hunter lab a 4°C y 2 unidades a 26°C, contrario al empaque metalizado que tuvo incrementos y decrementos en esta variable de respuesta; aunque se obtuvieron valores finales de ΔE menores a 10 unidades. En el inciso b) se muestra la evolución de la diferencia de color con atmosfera modificada (N_2), notándose que a estas condiciones se obtuvieron las mayores diferencias de color, siendo más evidentes en los experimentos con empaque de polietileno en ambas temperaturas, alcanzando valores de ΔE cercanos a las 10 unidades.

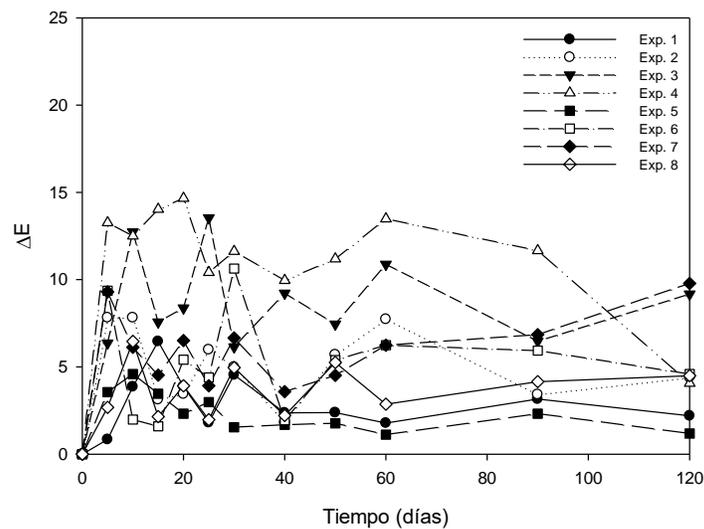
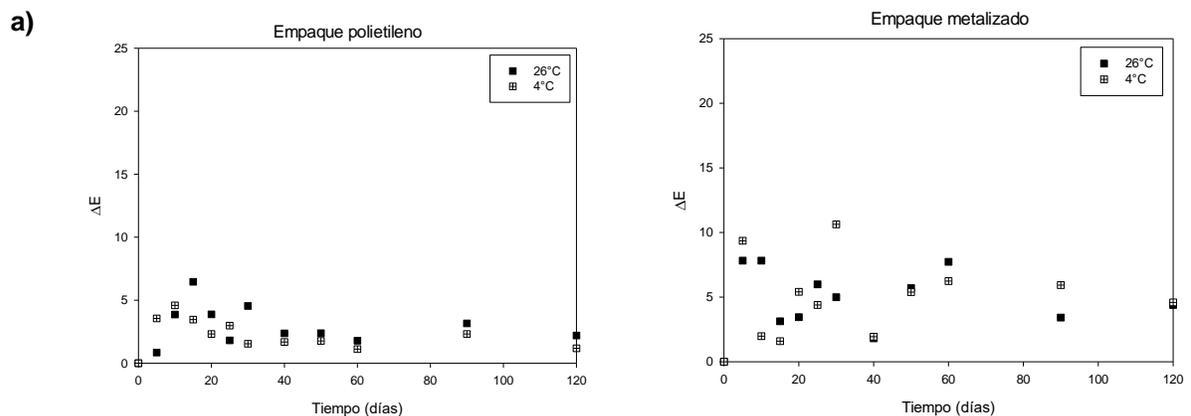


Figura 3.22 Evolución de la diferencia de color (ΔE) durante el almacenamiento



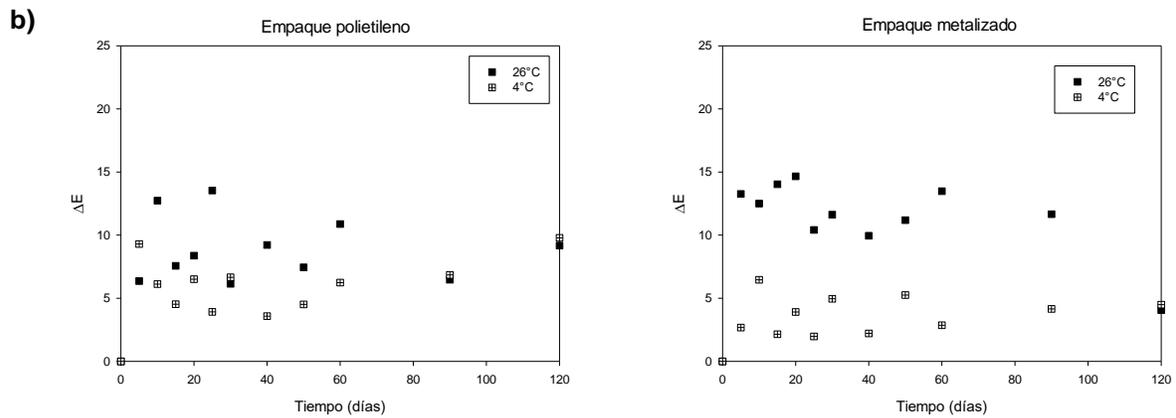


Figura 3.23 Evolución de la diferencia de color (ΔE) durante el almacenamiento a) vacío y b) N_2

El análisis estadístico aplicado a los resultados obtenidos durante el almacenamiento, demuestran mediante el análisis de varianza ($\alpha=0.05$) (Tabla 3.27) que estadísticamente ninguno de los factores tiene un efecto significativo sobre ΔE sin embargo todos los factores tienen una contribución en los cambios durante el almacenamiento, donde por ejemplo el tipo de atmosfera empleada tiene una mayor contribución a esta variabilidad con el 34.1%, siendo más notable en la atmosfera con N_2 el segundo factor que participa en los resultados presentados es la temperatura con un porcentaje de contribución del 24.4, todo eso se puede observar en la Figura 3.20 inciso b, en donde las mayores variaciones se encuentran en las muestras con atmosfera de N_2 a una temperatura de $4^\circ C$ en empaque metalizado.

Tabla 3.27 Análisis de Varianza de la variable Y_3 (ΔE) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temp ($^\circ C$)	1	15.125	15.125	2.69	0.176
Atmósfera	1	21.125	21.125	3.76	0.125
Empaque	1	3.125	3.125	0.56	0.497
Error	4	22.500	5.625		
Total	7	61.875			

3.7.4 Diferencia de peso (w)

En la Figura 3.24 se puede observar la evolución del peso de los ocho experimentos durante el almacenamiento. Como se puede notar en la figura, la evolución del peso fue constante y no presento variaciones significativas durante el tiempo de almacenamiento estudiado. En la Figura 3.25 se presenta la evolución del peso (w) durante el almacenamiento a) vacío y b) N₂. El análisis estadístico por medio del análisis de varianza ($\alpha=0.05$) señalo que no ninguna de los factores en cualquiera de sus niveles presentaba un efecto estadísticamente significativo sobre esta variable de respuesta (Tabla 3.28).

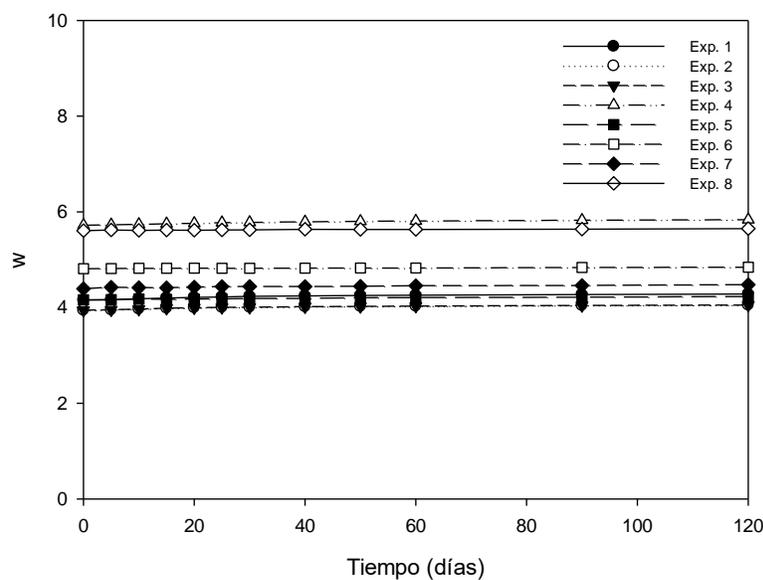
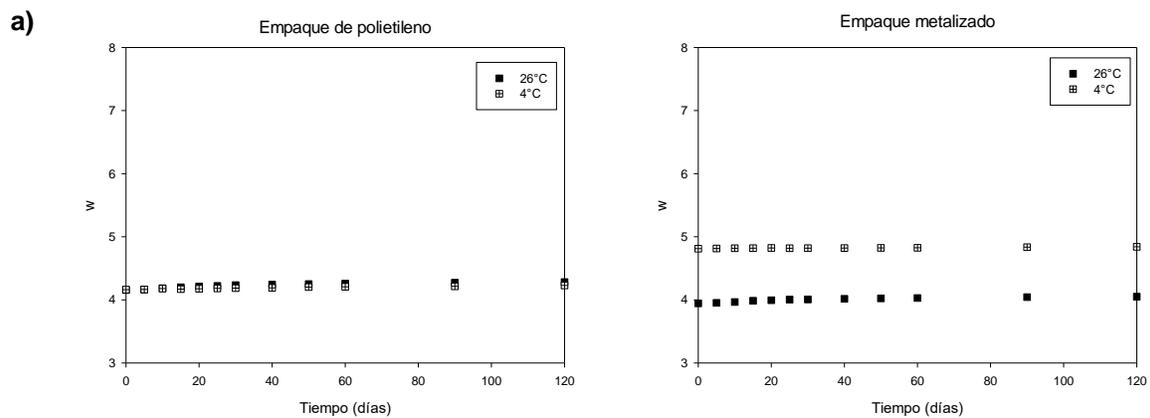


Figura 3.24 Evolución del peso (w) durante el almacenamiento



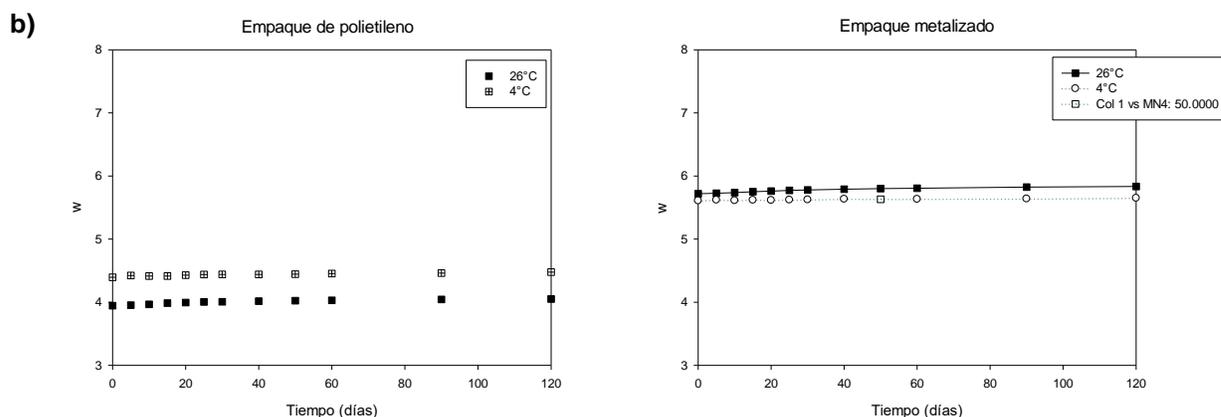


Figura 3.25 Evolución del peso (w) durante el almacenamiento a) vacío y b) N_2

Tabla 3.28 Análisis de Varianza de la variable Y_4 (w) de la microbiota de Kéfir durante el almacenamiento

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Temp ($^{\circ}C$)	1	0.1250	0.1250	0.44	0.544
Atmósfera	1	0.8450	0.8450	2.96	0.160
Empaque	1	1.4450	1.4450	5.07	0.087
Error	4	1.1400	0.2850		
Total	7	3.5550			

3.7.5 Análisis microbiológicos

El contenido final de los microorganismos probióticos analizados, para los ocho experimentos se presenta en la Tabla 3.29, mostrando en esta tabla los valores iniciales al inicio del periodo de almacenamiento y los obtenidos a los 120 días. Se encontraron evidencias significativas en los primeros cuatro experimentos mantenidos a una temperatura de $26^{\circ}C$ contra los almacenados a $4^{\circ}C$. Esto es resultados son congruentes con la a_w y contenido de humedad obtenida en cada uno de los datos. Ya que los últimos cuatro experimentos presentaron a lo largo del periodo de almacenamiento una mayor estabilidad en las variables de estudio. Estos resultados son congruentes a los presentados por Kök Taş (2015) el cual reporta una supervivencia de microorganismos contenidos en el Kéfir a temperaturas de $4^{\circ}C$ y un decremento a temperaturas de $24^{\circ}C$.

Tabla 3.29 Análisis microbiológicos de la microbiota de Kéfir liofilizada al inicio y final del almacenamiento

Experimento	Contenido inicial (Log UFC/g) de bacterias ácido lácticas	Contenido final (Log UFC/g) de bacterias ácido lácticas	Contenido inicial (Log UFC/g) de levaduras	Contenido final (Log UFC/g) de levaduras
1	8.1	---	7.7	---
2	8.1	---	7.7	---
3	8.1	---	7.7	---
4	8.1	3.9	7.7	6.3
5	8.1	7.7	7.7	7.0
6	8.1	7.8	7.7	7.1
7	8.1	7.6	7.7	6.6
8	8.1	7.7	7.7	6.7

Al término del periodo del almacenamiento y con los resultados estadísticos y microbiológicos obtenidos se puede concluir que la temperatura es el factor más importante para mantener la vida útil de este producto, siendo la temperatura recomendable de 4 °C, empaque metalizado y atmosfera al vacío. Ya que durante el periodo de almacenamiento, las condiciones ambientales afectan la viabilidad de los microorganismos, autores como Perera (2005) recomiendan temperaturas de almacenamiento para este tipo de productos entre 0-10°C, cuanto más baja sea la temperatura, más larga será la vida útil del producto almacenado, Chutrtong (2015) encontró mejores resultados de viabilidad en el Yogurt liofilizado y almacenado a 4°C que a 30°C, aunque una de sus recomendaciones es no almacenarlo por más de 90 días.

Parte II Resultados experimentales del proceso de secado por aspersión del Kéfir

3.8 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del Kéfir

Antes de ser sometida el Kéfir (Figura 3.24) al proceso de secado por aspersión, fue caracterizado fisicoquímica y microbiológicamente. Los resultados se presentan en la Tabla 3.30.



Figura 3.26 Kéfir

Tabla 3.30 Caracterización fisicoquímica y microbiológica del Kéfir

Análisis	Resultado
Humedad (%X)	89.75
Sólidos totales (%)	10.25
Acidez g/l (ácido láctico)	1.22
pH	3.86
Parámetro de color <i>L</i>	17.97
Parámetro de color <i>a</i>	4.45
Parámetro de color <i>b</i>	10.90
Diferencia de color (ΔE)	1.71
Log UFC/g bacterias ácido lácticas	8.68
Log UFC/g Levaduras	9.10

Como se muestra en la Tabla 3.30, el alto contenido de humedad por arriba del 89%. El Kéfir es un medio excelente para el desarrollo y proliferación de microorganismos ajenos al

producto; adicional a ello y, debido al proceso de doble fermentación (ácido-alcohólica) necesario para su elaboración; el cual, no es detenido cuando el producto a alcanzado las características idóneas se corre el riesgo de una sobre acidificación o deterioro del mismo. por lo que este producto tiende a una alta inestabilidad haciéndolo susceptible al crecimiento microbiano y a reacciones enzimáticas que afectaran su calidad y viabilidad durante el almacenamiento (Norbrillinda et al., 2016). Sin embargo, también se puede notar el alto contenido de sólidos (10%), lo que hace al Kéfir un candidato idóneo para el secado por aspersión. En relación con los parámetros de color, los resultados de luminosidad L , y la cromaticidad a y b indican que el Kéfir presenta un ligero color blanco, y tenue crema-naranja, con una diferencia de color respecto a una placa blanca de 1.71 (Figura 3.27).

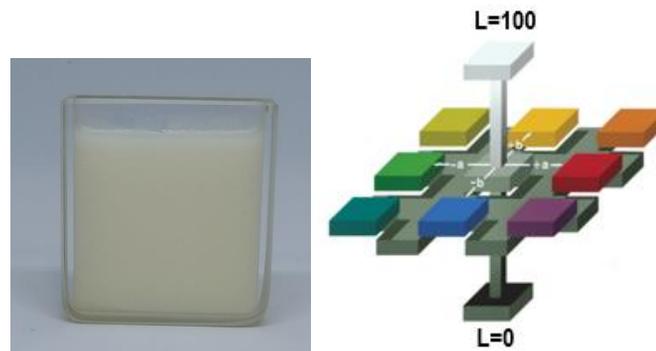


Figura 3.27 Kéfir y diagrama Hunter L , a , b

3.9 Secado por aspersión del Kéfir

Bajo las condiciones preestablecidas en el diseño de experimentos ortogonal $L_9 3^3$ fue llevado a cabo el secado por aspersión del Kéfir en un secador mini spray Büchi Modelo 290. Los niveles seleccionados codificados para cada variable de respuesta fueron presentados en la Tabla 2.3. En donde X_1 (temperatura del aire de entrada) fue considerado en 125, 135 y 145° C; X_2 (% maltodextrina) fue seleccionada al 20, 30 y 40% y X_3 (Temperatura del aire de salida) fue estimada a 70, 75 y 80°C. Las variables de respuesta analizadas fueron: Y_1 : contenido de humedad (% X), Y_2 : actividad de agua (a_w), $Y_{3, 4, 5}$: parámetros de color L , a y b , Y_6 : diferencia de color (ΔE), Y_7 : % acidez titulable (g/l de ácido láctico), Y_8 : log UFC/g bacterias ácido-lácticas, Y_9 : log UFC/g levaduras.

3.9.1 Humedad y actividad de agua en el Kéfir deshidratado

En la Tabla 3.31 se exponen los resultados experimentales obtenidos en el proceso de aspersión al que fue sometido el Kéfir, para las variables de respuesta Y_1 : % contenido de humedad (% X) y Y_2 : actividad de agua (a_w). Valores como el contenido de humedad y la actividad de agua son factores primordiales en la estabilidad de productos deshidratados, por lo que valores menores al 10 en el % X y 0.6 de a_w , son recomendables para la estabilidad microbiológica del producto final (Tapia et al., 2008; P. Fellows, 2000). En dicha tabla se puede observar que los valores más altos en el % X fueron obtenidos con temperaturas de salida de 70°C y diferentes niveles en la temperatura de entrada, no siendo influenciada por el % de maltodextrina contrario a lo presentado por Mishra et al. (2014) que reporta que la temperatura de entrada y los niveles de maltodextrina afectaron significativamente a la humedad de la muestra de estudio (jugo de amla), autores como Atalar & Dervisoglu (2015) reportan que a altas temperaturas de salida el % de humedad disminuye. Por otra parte Quek et al., (2007) afirma que a un caudal constante, el contenido de humedad de los polvos atomizados disminuye con el aumento de la temperatura del aire de entrada y salida además de obtener valores de humedad menores cuando la concentración de maltodextrina incrementa.

Tabla 3.31 Valores experimentales para las variables de respuesta % X y a_w

Exp. No.	X_1 T_1 (°C)	X_2 M (%)	X_3 T_2 (°C)	Y_1 % X	Y_2 a_w
1	1	1	1	4.30	0.185
2	1	2	2	3.81	0.271
3	1	3	3	4.53	0.244
4	2	1	2	3.94	0.192
5	2	2	3	3.57	0.378
6	2	3	1	5.42	0.324
7	3	1	3	3.08	0.219
8	3	2	1	4.12	0.324
9	3	3	2	2.81	0.424

De la misma tabla se puede comentar que la mayoría de los valores obtenidos en el % X se encuentran por debajo del %5 y a_w menores al 0.5, siendo el valor mínimo obtenido de % X= 2.81 y a_w =0.424, mismo que corresponde a niveles de temperatura de entrada de

145°C, con una concentración de maltodextrina del 40% y una temperatura de salida del 75°C, es importante resaltar que como factores externos no controlables para realizar el secado por aspersión se encuentra la humedad relativa y temperatura ambiente por lo que las corridas realizadas a estas condiciones dichos valores se encontraban a HR: 50% y temperatura ambiente: 29°C. el valor experimental más alto obtenido en esta variable de respuesta Y_1 fue 5.42% en niveles de operación X_1 :145°C, X_2 40% y X_3 : del 75°C, HR: 59 y temperatura ambiente: 26°C. resultados experimentales que indican que los polvos obtenidos son microbiológicamente estables, ya que los valores obtenidos del contenido de humedad y los valores de actividad de agua fueron <6 % y <0,60, respectivamente En general, los alimentos con $a_w < 0,6$ se consideran microbiológicamente estables y, si se produce algún deterioro, se induce por reacciones químicas y no por microorganismos. A partir de los resultados (Tabla 3.26) se puede afirmar que los resultados de la a_w en el Kéfir deshidratado se situaron en el rango de 0.18-0.432 Esto significaba que los polvos obtenidos por el secado por aspersión son microbiológicamente estables (Su & Mujumdar 2015; Badui, 2006) permitiendo al producto mantener una estabilidad microbiológica durante el almacenamiento, donde se puede producir el deterioro de los polvos cuando se producen reacciones químicas distintas a las de los microorganismos indujeron el deterioro. Por lo tanto, la los polvos producidos pueden tener una vida útil más larga debido a la baja actividad del agua, lo que implica que hay menos agua libre disponible para las reacciones bioquímicas (Quek et al., 2007).

3.9.1.1 Análisis estadístico del contenido de humedad

De los resultados experimentales y a partir del ANOVA que se presenta en la Tabla 3.32, los resultados indican que los factores y niveles no tuvieron un efecto significativo sobre esta variable de respuesta esto a $p= 0.19945 > 0.1$ y $F = 2.13460 < F_{crit} = 3.46330$, y $p = 0.19945 > 0.05$ and $F = 2.13460 < F_{crit} = 5.14325$. No obstante, la importancia del efecto de cada factor sobre la variable de respuesta analizada fue determinado por el rango máximo de los resultados obtenidos para cada una de los factores, en donde X_3 : temperatura de salida presenta el mayor rango (3.28) lo que indica la contribución que tiene esta variable de entrada sobre la variable de respuesta analizada.

Tabla 3.32 Análisis del % de humedad en el producto final deshidratado de Kéfir

Análisis de datos para el % X	Factores		
	X ₁	X ₂	X ₃
K ₁	12.64	11.32	13.84
K ₂	12.93	11.50	10.56
K ₃	10.01	12.76	11.18
R	2.92	1.44	3.28
F	1.64628	0.27613	2.13460
p Value	0.26918	0.76786	0.19945

3.9.1.2 Modelo matemático para predecir la humedad

Regresión múltiple (Minitab 18.0) fue utilizada con base en la Ecuación 2.2 para la obtención del modelo matemático de segundo orden, que permitieran predecir el comportamiento de las propiedades finales del producto deshidratado y los parámetros de operación establecidos en el diseño de experimentos. El modelo matemático para esta variable de respuesta (Y₁) se presenta en la Ecuación 3.6 con una R² de 90.91 % lo que indica que el modelo tiene un ajuste aceptable con los datos experimentales obtenidos.

$$Y_1 = 5.73 + 2.43 X_1 - 1.39 X_2 - 2.31 X_3 - 0.535 X_1^2 + 0.362 X_2^2 + 0.650 X_3^2 - 0.365 X_1 X_3 \quad 3.6$$

El modelo matemático para esta variable de respuesta (Y₁) se presenta en la Ecuación 6.2 con una R² de 90.91 % lo que indica que el modelo tiene un ajuste aceptable con los datos experimentales obtenidos. El mayor coeficiente obtenido fue el de la variable de entrada X₁ (2.43) lo que indica que una variable que influye en el contenido de humedad.

De acuerdo a la Ecuación 3.6, se presentan en la Figura 3.28. los valores predichos de Y₁ para el Kéfir a diferentes temperaturas de entrada y % concentración de maltodextrina. La temperatura de salida se consideró constante a 75°C. La Figura 3.28 muestra que el %X incrementa con el aumento el % de maltodextrina utilizado y con temperaturas inferiores a 145°C. También es observado que cuando la temperatura es de 145°C y el % de maltodextrina es menor al 40% el % X es menor. La Tabla 3.39 muestra el error relativo entre el valor experimental y predicho de esta variable de respuesta. El menor valor

obtenido en el error de Y_1 fue de cercano a cero a condiciones de operación de X_1 : 145 °C, X_2 : 30%, X_3 : 70°C. La diferencia entre el máximo error relativo del valor experimental y predicho fue de 9.7%.

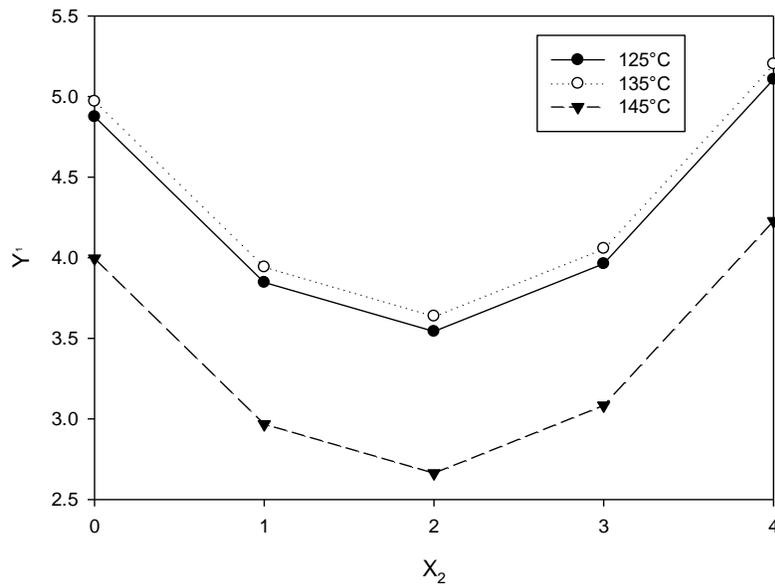


Figura 3.28 Contenido de humedad (% X) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina

3.9.1.3 Análisis estadístico de la actividad de agua

Los resultados experimentales y el análisis estadístico del ANOVA que se presenta en la Tabla 3.33 muestran que a una $p = 0.06643 < 0.1$ y $F = 4.40752 > F_{crit} = 3.36330$ y $p = 0.06643 > 0.05$ and $F = 4.40752 < F_{crit} = 5.14325$ el % de concentración de maltodextrina (X_1) tuvo un efecto significativo en esta variable de respuesta, contrario a las otras variables de respuesta X_1 y X_2 que no afectaron estadísticamente. También esto se puede corroborar el efecto de X_2 con en el cambio máximo al obtener el máximo valor de 0.396, seguido por X_1 (0.296) que en segunda instancia tiene un efecto sobre los resultados experimentales.

Tabla 3.33 Análisis de la actividad de agua (a_w) en el producto final deshidratado de Kéfir

Análisis de datos para a_w	Factores		
	X_1	X_2	X_3
K_1	0.700	0.596	0.833
K_2	0.894	0.973	0.887
K_3	0.967	0.992	0.841
R	0.267	0.396	0.054
F	0.88164	4.40752	0.03070
p Value	0.46165	0.06643	0.96992

3.9.1.4 Modelo matemático para predecir la actividad de agua

Mediante el uso del software Minitab 18.0 se obtuvo a partir de la ecuación 2.2. El modelo matemático para esta variable de respuesta (Y_2) es mostrado en la Ecuación 3.7, con un R^2 de 99.13 % lo que indica el ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos.

$$Y_2 = 0.050 - 0.0082 X_1 + 0.1713 X_2 - 0.0320 X_3 - 0.0202 X_1^2 - 0.0597 X_2^2 + 0.0167 X_3^2 + 0.0067 X_1 X_2 \quad 3.7$$

El mayor coeficiente fue el de la variable de entrada X_2 indicando la influencia de este factor sobre la actividad de agua. En base a la Ecuación 3.7, se presenta en la Figura 3.29 los valores predichos de Y_2 para el Kéfir sometido al secado por aspersión, considerando diferentes temperaturas de entrada (X_1) y % concentración de maltodextrina (X_2). La temperatura de salida fue considerada a 75°C. De la Figura 3.27 se puede determinar que la a_w incrementa a mayor temperatura y se mantiene en valores menores a 0.25 a temperaturas de 125°C; aunque los valores obtenidos a las distintas temperaturas de entrada se encuentran por debajo de 0.6, valores aceptables para la estabilidad microbiológica del producto. En la Tabla 3.44 se presenta el error relativo entre los valores experimentales y predichos para esta variable de respuesta. El menor valor obtenido en el error en esta variable de respuesta fue de 0.1% que corresponde al experimento 5 y condiciones de operación X_1 : 135 °C, X_2 : 30%, X_3 : 80°C. La diferencia entre el máximo error relativo del valor experimental y predicho fue de 4.3 %.

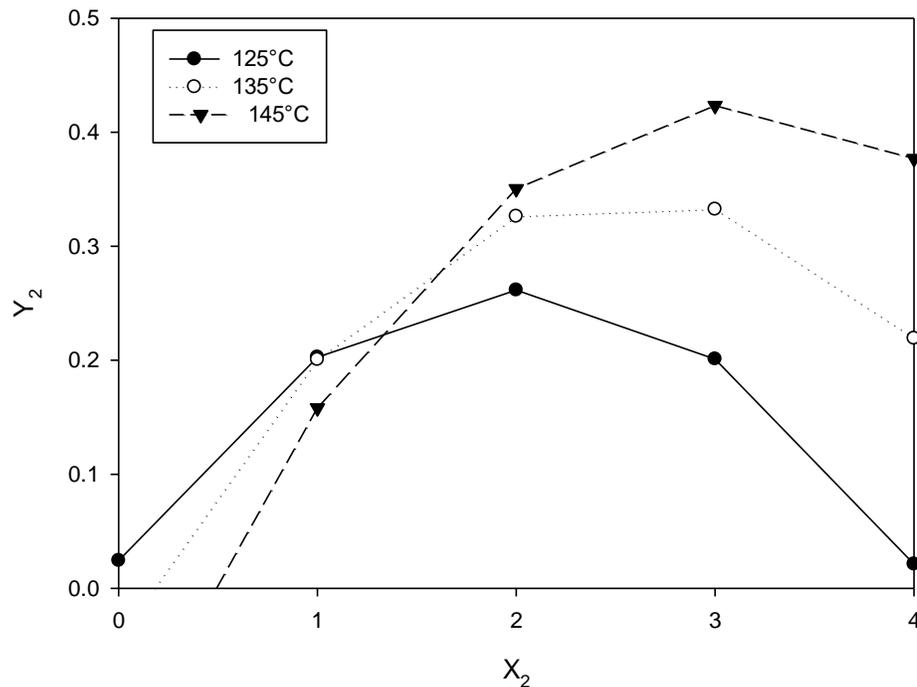


Figura 3.29 Actividad de agua (a_w) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina

3.9.2 Parámetros de color en el Kéfir deshidratado

En otros apartados, se ha hecho mención de la importancia y concepto del color de los productos alimenticios deshidratados cuando el consumidor los compara con el color del producto fresco, esta percepción de color puede ser una decisión de aceptación o rechazo en el mercado. En la Tabla 3.34, se exponen los resultados experimentales de las variables de respuesta Y_3 , Y_4 y Y_5 correspondientes a los parámetros de color (L , a y b). En esta tabla se puede observar que el mayor valor de Y_3 : luminosidad (L) corresponde al experimento No. 9 con un valor de 69.75, de Y_4 : cromaticidad (a) de -0.85 y en el experimento 1 y Y_5 : cromaticidad (b) de 5.48, las variaciones en estos parámetros se ven modificadas en el valor original debido a las temperaturas y tiempos de permanencia en la cámara de secado; adicional a las características presentes en los materiales de pared empleados para proteger al alimento de daños estructurales.

Tabla 3.34 Valores experimentales para los parámetros de color L a y b

Exp. No.	X_1 T_1 (°C)	X_2 M (%)	X_3 T_2 (°C)	Y_3 L	Y_4 a	Y_5 b
1	1	1	1	66.56	-0.85	4.68
2	1	2	2	62.69	-0.73	3.66
3	1	3	3	67.34	-0.23	1.61
4	2	1	2	65.78	-0.74	5.48
5	2	2	3	65.11	-0.57	2.58
6	2	3	1	68.16	-0.08	0.52
7	3	1	3	67.03	-0.66	3.97
8	3	2	1	66.07	-0.68	3.01
9	3	3	2	69.75	-0.38	2.59

3.9.2.1 Análisis estadístico del contenido de los parámetros de color

En las Tabla 3.35 se presentan los análisis estadísticos de los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de color (Y_3 , Y_4 y Y_5). Para todas las variables de respuesta el análisis estadístico, reveló que la variable de entrada Y_2 : % Maltodextrina afectó significativamente a todas estas variables de respuesta en probabilidad de 0.05 y 0.1. Para Y_3 : luminosidad (L) ($p=0.03086 < 0.1$ y $F= 6.56454 > F_{crit}=3.36330$ y $p=0.03086 < 0.1$ y $F= 6.56454 > F_{crit}=5.14325$), para Y_4 : cromaticidad (a) los valores fueron negativos (teniendo a tonalidades verdes) ($p=0.00285 < 0.1$ y $F= 18.14883 > F_{crit}=3.36330$ y $p=0.00285 < 0.1$ y $F= 18.14883 > F_{crit}=5.14325$), para Y_5 : cromaticidad (b) ($p=0.00900 < 0.1$ y $F= 11.42454 > F_{crit}=3.36330$ y $p=0.00900 < 0.1$ y $F= 11.42454 > F_{crit}=5.14325$) el color tendió a amarillo, observándose que a menor % de maltodextrina el valor de cromaticidad en b fue menor.

Tabla 3.35 Análisis de varianza de los parámetros de color (L , a , b)

Análisis de datos para L , a y b		Factores		
		X_1	X_2	X_3
L^*	K_{L1}	196.59	199.37	200.79
	K_{L2}	199.05	193.87	198.22
	K_{L3}	202.85	205.25	199.48
	R'_L	6.26	11.38	2.57
	F	0.80121	6.56454	0.10879
	p Value	0.49158	0.03086	0.89864

<i>a</i> *	K_{a1}	-1.81	-2.25	-1.61
	K_{a2}	-1.39	-1.98	-1.85
	K_{a3}	-1.72	-0.69	-1.46
	R'_a	0.42	1.56	0.39
	<i>F</i>	0.19275	18.14883	0.10879
	<i>p</i> Value	0.82960	0.00285	0.89864
<i>b</i> *	K_{b1}	9.95	14.13	8.21
	K_{b2}	8.58	9.25	11.73
	K_{b3}	9.57	4.72	8.16
	R'_b	1.37	9.41	3.57
	<i>F</i>	0.05465	11.42454	0.52870
	<i>p</i> Value	0.94729	0.00900	0.61450

3.9.3 Diferencia de color

Los resultados obtenidos en cada una de las corridas experimentales de la variable de respuesta Y_6 : Diferencia de color (ΔE) se presentan en la Tabla 3.36. El color es un rasgo distintivo de los alimentos y cuando el consumidor compara de manera visual el color que, el percibió visualmente del producto original vs el color del producto deshidratado puede establecer un juicio de valor que implique el rechazo o aceptación del nuevo producto. No obstante, en la química de los alimentos para poder determinar la diferencia de color entre un producto fresco o deshidratado se debe contar técnicas y métodos de análisis y contar con valores de referencia, comparando además las muestras en condiciones idénticas de iluminación. Para el caso específico del Kéfir deshidratado y debido a que pasa de líquido a sólido y que para su acondicionamiento se utilizan materiales de pared, se tomó como estándar de referencia una placa blanca con valores: $L=93.54$, $a=-1.30$, $b=2.51$ que permitió comparar el color final obtenido al final del secado por aspersion. En la tabla se puede confirmar que no hubo diferencias superiores al 6% con respecto al color blanco percibido por el ojo humano. El valor más bajo para esta variable de respuesta fue de 2.81 a condiciones $X_1= 145^\circ\text{C}$, $X_2= 40\%$ de maltodextrina y $X_3= 75^\circ\text{C}$.

Tabla 3.36 Valores experimentales para ΔE

Exp. No.	X₁ T₁ (°C)	X₂ M (%)	X₃ T₂ (°C)	Y₆ ΔE
1	1	1	1	4.30
2	1	2	2	3.81
3	1	3	3	4.53
4	2	1	2	3.94
5	2	2	3	3.57
6	2	3	1	5.42
7	3	1	3	3.08
8	3	2	1	4.12
9	3	3	2	2.81

3.9.3.1 Análisis estadístico de la diferencia de color

En la Tabla 3.37 se expone el análisis de varianza para esta variable de respuesta los resultados revelan que ΔE en el producto final es afectado significativamente por X_2 en todos sus niveles ($p=0.03664 < 0.1$ y $F= 6.03273 > F_{crit}=3.36330$ y $p=0.03664 < 0.1$ y $F= 6.03273 > F_{crit}=5.14325$) contrario a otras investigaciones que afirman que el color de los polvos se ha oscurecido a mayor temperatura de entrada (Quek et al., 2007). Las otras variables de entrada X_1 y X_3 no tuvieron un efecto estadísticamente significativo.

Tabla 3.37 Análisis de ΔE en el producto final deshidratado de Kéfir

Análisis de datos para ΔE	Factores		
	X₁	X₂	X₃
K_1	70.64	68.49	66.94
K_2	68.63	72.86	69.35
K_3	64.93	62.85	67.91
R	5.71	10.01	2.41
F	0.85838	6.03273	0.12173
p Value	0.47006	0.03664	0.88752

3.9.3.2 Modelo matemático para predecir la diferencia de color

A partir de la ecuación 2.2 de segundo orden se presenta el modelo matemático codificado para esta variable de respuesta (Ecuación 3.7):

$$Y_6 = 10.94 + 1.95 X_1 + 10.42 X_2 + 4.06 X_3 - 0.282 X_1^2 - 2.397 X_2^2 - 1.086 X_3^2 - 0.888 X_1 X_2 \quad 3.7$$

La R^2 obtenida para este modelo matemático fue de 99.21%, indicando un ajuste adecuado a los datos experimentales obtenidos. De esta ecuación y mediante el valor del máximo coeficiente obtenido (10.42) se puede corroborar el efecto del X_2 sobre Y_6 . En la Tabla 3.44, se presentan los datos experimentales (Exp-R) y resultados predichos (Pre-R) del Kéfir obtenido por el secado por aspersion. En esta tabla se pueden observar un máximo valor experimental del 0.9%. La Figura 3.30 presenta una relación entre la diferencia de color (ΔE) considerando diferentes temperaturas de entrada y % de maltodextrina, manteniendo constante la temperatura de salida. Como se puede observar en dicha grafica a valores de $X_2 =$ del 30% y a cualquier temperatura seleccionada, se presenta el máximo cambio de color en el producto.

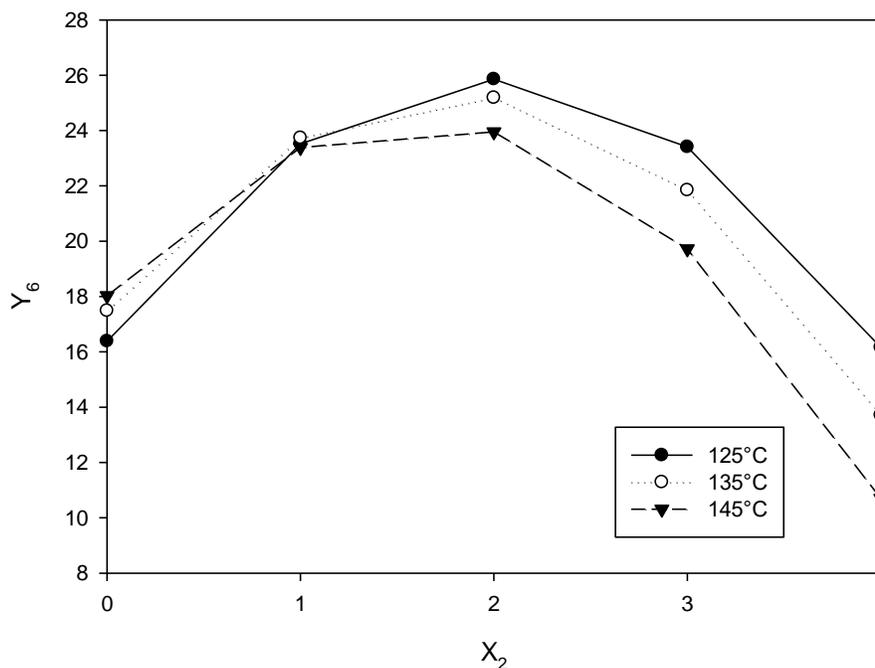


Figura 3.30 Diferencia de color (ΔE) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina

En la Figura 3.31 a continuación mostrada se presentan las imágenes de los 9 experimentos realizados:



Figura 3.31 Muestras visuales del color obtenido en el Kéfir deshidratado

3.9.4 Acidez titulable

El contenido de acidez en un alimento es un valor de referencia que permite determinar el sabor de un alimento, en el caso del Kéfir antes del secado se obtuvo una acidez promedio de 1.0%. En la Tabla 3.38 se presentan los resultados de los valores experimentales obtenidos después del secado por aspersión, observándose valores por debajo del 14% considerando que el rango del porcentaje de sólidos se encontraba en un rango de 33 a 69% debido al % de maltodextrina agregado al producto, el menor valor obtenido fue el del experimento 6 que corresponde a X_1 : 135°C, X_2 : 40% y X_3 : 70°C. y el mayor valor de acidez se encuentra en el experimento 4 con niveles de X_1 : 135°C, X_2 : 20% y X_3 : 75°C.

Tabla 3.38 Valores experimentales para los parámetros de color L a y b

Exp. No.	X₁ T₁ (°C)	X₂ M (%)	X₃ T₂ (°C)	Y₇ % acidez
1	1	1	1	21.47
2	1	2	2	13.83
3	1	3	3	16.4
4	2	1	2	35.17
5	2	2	3	23.51
6	2	3	1	12.11
7	3	1	3	32.56
8	3	2	1	23.64
9	3	3	2	15.93

3.9.4.1 Análisis estadístico del contenido de acidez

En la Tabla 3.39 se presenta el análisis de los datos de esta variable de respuesta (Y_7), el ANOVA fue realizado a una probabilidad de 0.05 y 0.1 respectivamente. Con este análisis se pudo determinar que la variable de entrada X_2 (% maltodextrina) afectó significativamente en todos sus niveles a esta variable de respuesta en el Kéfir deshidratado. ($p=0.04122 > 0.1$ y $F = 5.68450 < F_{crit} = 3.46330$, y $p = 0.04122 > 0.05$ and $F = 5.68450 < F_{crit} = 5.14325$), en contraste a X_1 y X_2 que no presentaron un efecto sobre este variable de respuesta.

Tabla 3.39 Análisis de varianza de la acides total (% ácido láctico)

Análisis de datos para % acidez	Factores		
	X₁	X₂	X₃
K_1	51.70	89.20	57.22
K_2	70.79	60.98	64.93
K_3	72.13	44.44	72.47
R	20.43	44.76	15.25
F	0.60096	5.68450	0.24078
p Value	0.57824	0.04122	0.79326

3.9.4.2 Modelo matemático del contenido de acidez

El modelo matemático de segundo orden para esta variable de respuesta se presenta en la Ecuación 3.8, con una R^2 de 99.81%, reflejando este valor el ajuste del modelo a los datos experimentales. Así mismo, en base a los coeficientes obtenidos se puede confirmar que X_2 es la variable de entrada que tienen el mayor coeficiente (28.17) lo cual refleja el mayor efecto significativo, seguido por X_1 (25.57).

$$Y_7 = 14.39 + 25.57 X_1 - 28.17 X_2 + 12.88 X_3 - 2.958 X_1^2 + 4.531 X_2^2 - 5.168 X_1 X_3 \quad 3.8$$

En la Figura 3.32 se presenta la predicción de Y_7 considerando una temperatura de salida constante a 125°C y diferentes temperaturas de entrada (X_1) así como el % de maltodextrina (X_2). En la gráfica se puede observar que a menor temperatura y % de maltodextrina disminuye el % de acidez, obteniéndose el valor más bajo a condiciones de operación de X_1 :125°C, X_2 : 40% y X_3 : 75°C.

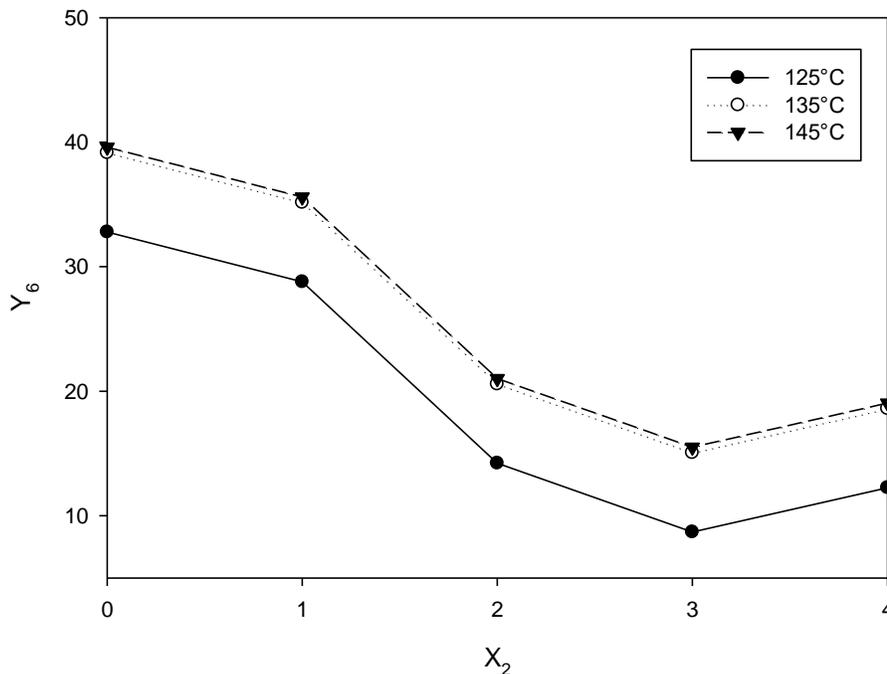


Figura 3.32 % del contenido de acidez (expresado como ácido láctico) predicho a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina

3.9.5 Bacterias ácido-lácticas en el Kéfir deshidratado

Tanto la leche UHT como la leche light que fueron utilizadas como sustratos de fermentación permitieron obtener un producto fermentado con bacterias lácticas y recuentos de levaduras superiores a 8 ciclos logarítmicos. Sin embargo, después del secado por aspersión, la viabilidad se vio afectada por los parámetros de operación.

En la Tabla 3.40 se presenta los valores experimentales obtenidos después del ser sometido el Kéfir al secado al secado por aspersión, teniendo en cuenta el estrés que sufren los microorganismos durante todo el proceso de elaboración y secado, se encontró a pesar de ello, resultados por arriba de siete ciclos logarítmicos, con respecto al valor inicial que fue superior a 8 ciclos logarítmicos la pérdida no fue relevante, contrario a lo presentado por Teijeiro et al. (2018) el cual reporta una significativa pérdida en la viabilidad de bacterias lácticas después del secado por aspersión mayor a dos ciclos logarítmicos. El mayor valor de supervivencia en las bacterias ácido-lácticas fue en el experimento 9 el cual fue llevado a cabo con niveles de X_1 :145°C, X_2 : 40% y X_3 : 75°C. estos resultados permiten afirmar que el producto final obtenido puede ser considerado como probiótico.

Tabla 3.40 Valores experimentales para las UFC/g de Bacterias ácido lácticas

Exp. No.	X_1	X_2	X_3	Y_8
	T_1 (°C)	M (%)	T_2 (°C)	Log (UFC/g) BAL
1	1	1	1	7.82
2	1	2	2	5.51
3	1	3	3	7.35
4	2	1	2	5.44
5	2	2	3	4.51
6	2	3	1	7.91
7	3	1	3	5.63
8	3	2	1	6.94
9	3	3	2	7.88

3.9.5.1 Análisis estadístico del contenido de bacterias ácido-lácticas

En la Tabla 3.41 se tiene el análisis de los datos experimentales obtenidos; así como, el ANOVA de estos resultados. Dicho ANOVA indica que ninguno de los factores tiene un

efecto sobre esta variable de respuesta microorganismos ($p=0.12589 > 0.1$ y $F= 2.98582 < F_{crit}=3.36330$ y $p=0.12589 > 0.05$ y $F= 2.98582 < F_{crit}=5.14325$). El efecto es visto en el rango máximo de los resultados en donde X_2 : % maltodextrina tiene la mayor diferencia (6.17) seguida por X_3 : temperatura de salida (5.18), sugiriendo que ambas variables de entrada contribuyen a la supervivencia de las bacterias ácido lácticas. Esta afirmación también soportada por los coeficientes obtenidos en la Ecuación de regresión 3.9.

Tabla 3.41 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de BAL

Análisis de datos para (Log UFC/g) BAL	Factores		
	X_1	X_2	X_3
K_1	20.68	18.89	22.67
K_2	17.85	16.96	18.83
K_3	20.45	23.13	17.49
R	2.83	6.17	5.18
F	0.42224	2.98582	1.69431
p Value	0.67365	0.12589	0.26100

3.9.5.2 Modelo matemático del contenido de bacterias ácido-lácticas

La Ecuación 3.9 muestra el modelo matemático para esta variable de respuesta (Y_8) con un valor de R^2 de 99.71% lo que indica que el modelo se ajusta a los datos experimentales obtenidos. La contribución de los factores sobre la supervivencia de las bacterias ácido-lácticas es confirmado por los coeficientes de dicha ecuación, siendo en primer lugar el de mayor contribución X_2 (5.314), seguido de X_3 (3.143).

$$Y_8 = 16.25 - 2.878 X_1 - 5.3143 X_2 - 3.143 X_3 + 0.748 X_1^2 + 1.352 X_2^2 + 0.417 X_3^2 + 0.307 X_2 X_3 \quad 3.9$$

En la Figura 3.33, se puede observar la relación existente entre las variables de entrada con respecto a la supervivencia de las bacterias ácido lácticas, en dicha Figura se consideran diferentes temperaturas de entrada y % de maltodextrina; manteniendo constante la temperatura de salida. Como se puede observar y tomando en cuenta los valores predichos y graficados a partir de la ecuación 3.9. se puede determinar que a un

mayor % de maltodextrina y a una temperatura de 145°C se obtendría valores cercanos a 8 ciclos logarítmicos.

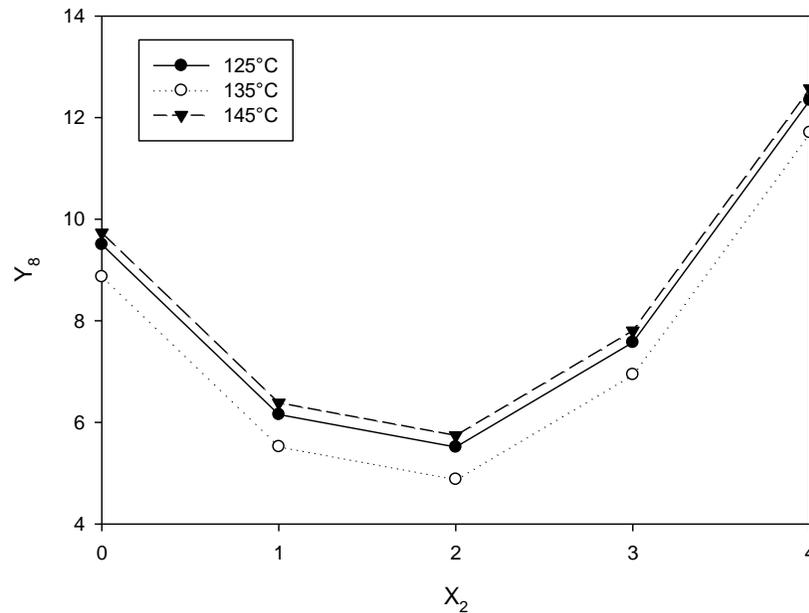


Figura 3.33 Contenido de bacterias ácido-lácticas (log (UFC/g) a diferentes niveles de temperatura de entrada y % concentración de maltodextrina

3.9.6 Levaduras en el Kéfir deshidratado

En la Tabla 3.42 se muestran los valores experimentales obtenidos de los experimentos al que fue sometido el Kéfir, considerando los daños estructurales que sufren las células y el estrés que sufren los microorganismos durante todo el proceso fabricación, los resultados obtenidos fueron favorables al obtener resultados por arriba de siete ciclos logarítmicos, con respecto al valor inicial que fue superior a 8 ciclos logarítmicos la pérdida no fue relevante, contrario a lo presentado por Teijeiro et al. (2018) el cual reporta una significativa pérdida en la viabilidad de bacterias lácticas después del secado por aspersión mayor a dos ciclos logarítmicos. El mayor valor de supervivencia en las bacterias ácido-lácticas fue en el experimento 9 el cual fue llevado a cabo con niveles de X₁:145°C, X₂: 40% y X₃: 75°C. estos resultados permiten afirmar que el producto final obtenido puede ser considerado como probiótico.

Tabla 3.42 Valores experimentales para las levaduras

Exp. No.	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₉
	T ₁ (°C)	M (%)	T ₂ (°C)	Log (UFC/g) Levaduras
1	1	1	1	7.74
2	1	2	2	5.44
3	1	3	3	7.42
4	2	1	2	6.10
5	2	2	3	4.95
6	2	3	1	7.90
7	3	1	3	5.72
8	3	2	1	6.94
9	3	3	2	8.08

3.9.6.1 Análisis estadístico del contenido de levaduras

En la Tabla 3.43 se muestra el análisis de los datos experimentales obtenidos; así como, el ANOVA de estos resultados. Dicho ANOVA indica que la variable de entrada X₂ tiene un efecto significativo sobre esta variable de respuesta a una probabilidad de 0.1 ($p=0.07797 > 0.1$ y $F= 4.02214 > F_{crit}=3.36330$ y $p=0.07797 > 0.05$ y $F= 4.02214 < F_{crit}=5.14325$), contrario a las otras variables de entrada que no presentaron efecto sobre ella. El efecto también es visto en el rango máximo de los resultados en donde X₂: % maltodextrina tiene la mayor diferencia (6.07) seguida por X₃: temperatura de salida (4.49), sugiriendo que ambas variables de entrada contribuyen a la supervivencia de las bacterias ácido lácticas.

Tabla 3.43 Análisis de varianza de la variable de respuesta Log de las UFC/g de levaduras

Análisis de datos para (Log UFC/g) Levaduras	Factores		
	X ₁	X ₂	X ₃
K ₁	20.60	19.56	22.58
K ₂	18.95	17.33	19.62
K ₃	20.74	23.40	18.09
R	1.79	6.07	4.49
F	0.19221	4.02214	1.38966
p Value	0.83002	0.07797	0.31921

3.9.6.2 Modelo matemático del contenido de levaduras

La Ecuación 3.10 muestra el modelo matemático para esta variable de respuesta (Y_9) con un valor de R^2 de 99.85 % lo que indica que el modelo se ajusta a los datos experimentales obtenidos. La contribución de los factores sobre la supervivencia de levaduras es confirmada por los coeficientes de dicha ecuación, siendo en primer lugar el de mayor contribución X_2 (5.830), seguido de X_3 (2.738).

$$Y_9 = 14.877 - 0.974 X_1 - 5.830 X_2 - 2.738 X_3 + 0.314 X_1^2 + 1.3833 X_2^2 + 0.2383 X_3^2 + 0.5183 X_2 X_3 \quad 3.10$$

En la Figura 3.34, se puede observar la relación existente entre las variables de entrada con respecto al contenido de las levaduras con respecto a la predicción realizada a partir de la ecuación 3.10, en esta Figura se consideran temperaturas de entrada de 125°, 135° y 145°C y distintos niveles en el % de maltodextrina; manteniendo siempre constante la temperatura de salida. Como se puede observar a un mayor % de maltodextrina y a una temperatura de 145°C se obtendría valores cercanos a 8 ciclos logarítmicos.

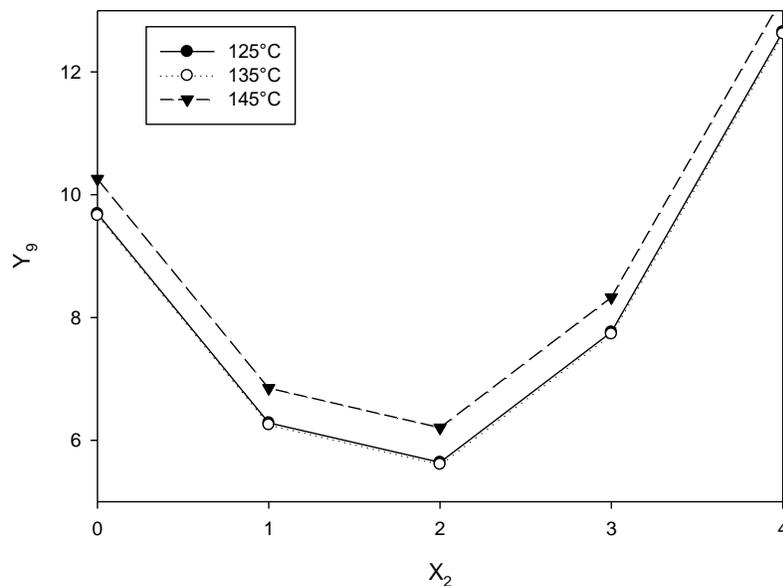


Figura 3.34 Contenido de levaduras (log (UFC/g)) a diferentes niveles de temperatura de entrada y concentración de maltodextrina

Tabla 3.44 Datos experimentales (Exp-R) y resultados predichos (Pre-R) del Kéfir deshidratado por secado por aspersión

Exp. No.	Factores																				
	% Humedad			Actividad de agua (a_w)			% acidez (g/l ácido láctico)			Diferencia de color (DC)						Log (UFC/g) de BAL			Log (UFC/g) de Levaduras		
	Exp-R	Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)	L*	a	b	ΔE	Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)	Exp-R	Pre-R	Error (%)
1	4.3	4.6	6.3	0.185	0.185	-0.2	21.5	21.1	-1.8	66.56	-0.85	4.68	22.72	22.72	0.0	7.8	7.7	-1.0	7.7	7.8	0.6
2	3.81	3.5	-7.0	0.271	0.262	-3.5	13.8	14.2	2.7	62.69	-0.73	3.66	26.05	25.86	-0.7	5.5	5.5	0.1	5.4	5.6	3.7
3	4.53	4.5	0.2	0.244	0.253	3.5	16.4	16.4	0.0	67.34	-0.23	1.61	21.87	22.04	0.8	7.4	7.4	1.2	7.4	7.8	4.7
4	3.94	3.9	0.1	0.192	0.201	4.5	35.2	35.1	-0.1	65.78	-0.74	5.48	23.56	23.74	0.7	5.4	5.5	1.5	6.1	6.3	2.5
5	3.57	3.8	7.8	0.378	0.378	-0.1	23.5	23.1	-1.7	65.11	-0.57	2.58	23.83	23.82	-0.1	4.5	4.4	-1.6	5.0	5.1	3.0
6	5.42	5.1	-5.0	0.324	0.314	-3.0	12.1	12.5	3.3	68.16	-0.08	0.52	21.24	21.05	-0.9	7.9	7.9	0.0	7.9	8.2	3.8
7	3.08	2.8	-8.7	0.219	0.210	-4.3	32.6	33.0	1.3	67.03	-0.66	3.97	22.21	22.02	-0.9	5.6	5.6	0.1	5.7	5.8	1.7
8	4.12	4.118	0.0	0.324	0.332	2.6	23.6	23.6	0.0	66.07	-0.68	3.01	22.98	23.15	0.7	6.9	7.0	1.2	6.9	7.2	3.6
9	2.81	3.1	9.7	0.424	0.423	-0.2	15.9	15.5	-2.7	69.75	-0.38	2.59	19.74	19.72	-0.1	7.9	7.8	-1.0	8.1	8.3	3.1

3.10 Optimización según Taguchi

Siguiendo la misma metodología que para el secado por liofilización; se determinaron para el secado por aspersion las condiciones óptimas de operación según Taguchi, siendo consideradas para su optimización variables de respuesta como el % de humedad y a_w , debido a que estas variables afectan la vida útil del producto deshidratado, junto a su estabilidad microbiológica. Por otra parte, el contenido de microorganismos probióticos fue considerado como una variable de respuesta vital ya que; es quien otorga la funcionalidad del producto. Mediante la metodología Taguchi, el análisis de medias, la señal de ruido/objetivo de respuesta y el análisis de varianza fue determinado la contribución de cada factor sobre las variables de respuesta y a su vez, fue posible identificar que parámetros fueron los de mayor influencia, considerando los principales efectos de cada una de las variables de entrada o factores con respecto al objetivo de respuesta deseado como "lo más pequeño es mejor", "lo más grande es mejor" o "lo nominal es lo mejor". Para el caso de las variables de respuesta seleccionadas en la Tabla 3.45 se expone el objetivo de respuesta esperado.

Tabla 3.45 Variables de respuesta seleccionadas y el valor objetivo esperado

Variable de respuesta	Objetivo de respuesta
%X	Lo más pequeño es lo mejor
a_w	Lo más pequeño es lo mejor
Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas	Lo más grande es lo mejor
Log (UFC/g) de levaduras	Lo más grande es lo mejor

En la Figura 3.35, 3.36, 3.37, 3.38 se presentan las gráficas de efectos principales para medias y para el valor objetivo de cada una de las variables de respuesta seleccionadas. A partir de esta información y con los datos estadísticos del análisis de varianza, se determinaron los niveles que permiten alcanzar el valor deseado.

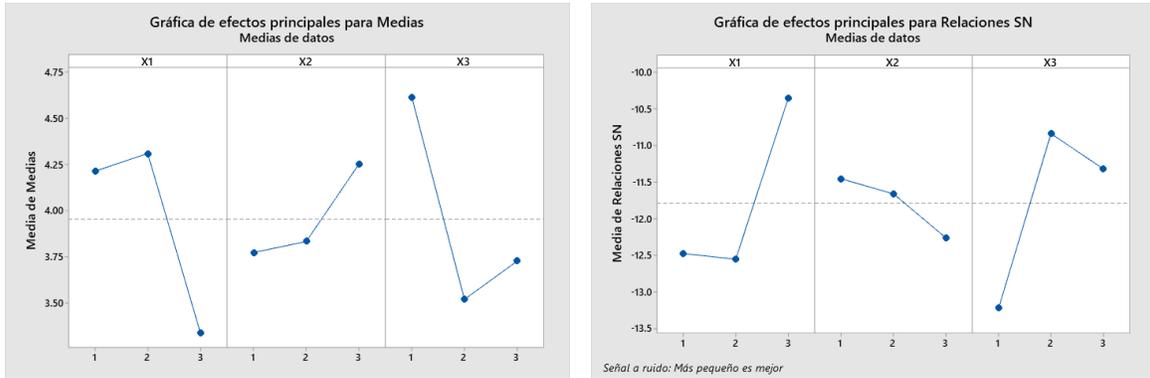


Figura 3.35 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el % de humedad

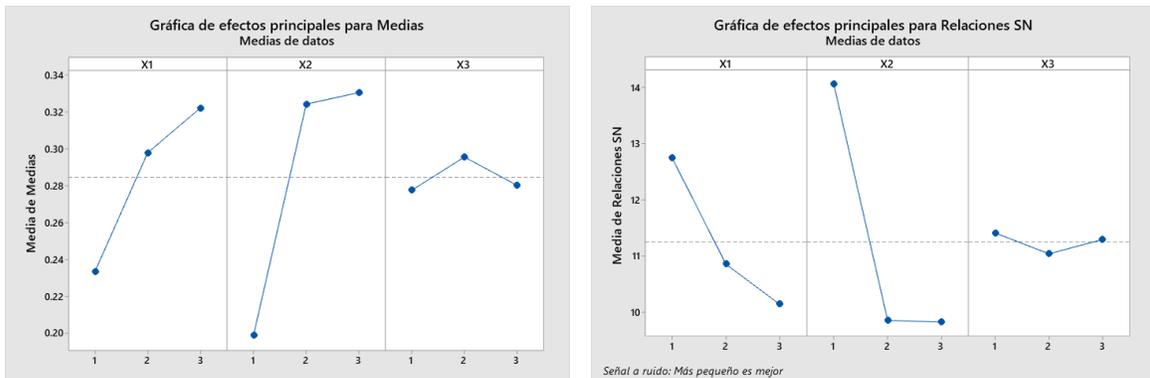


Figura 3.36 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para a_w

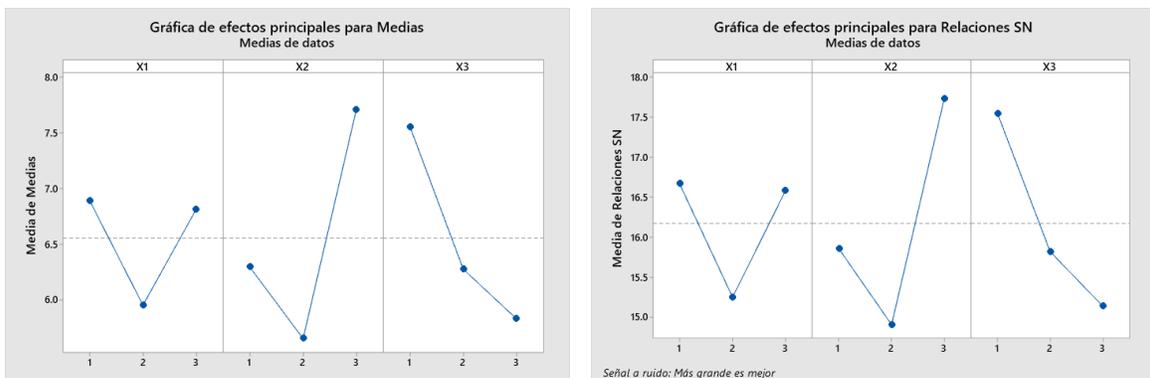


Figura 3.37 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas

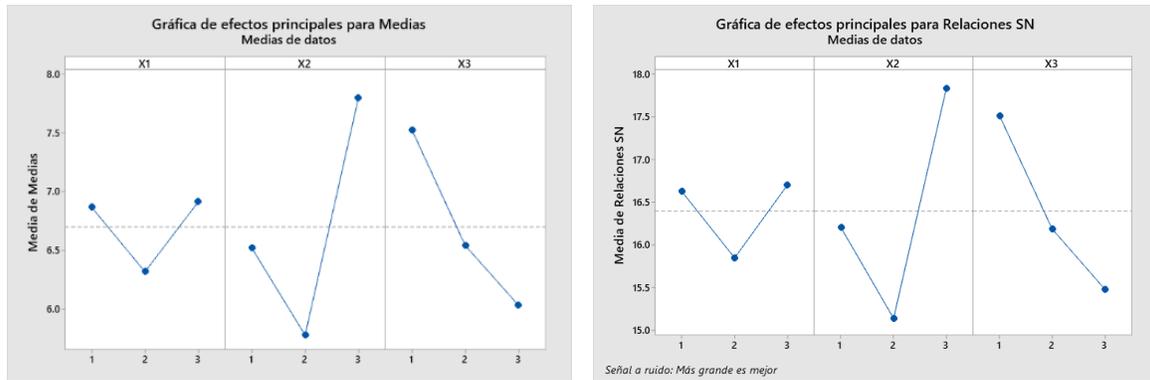


Figura 3.38 Gráfica de efectos principales para medias y valor objetivo para el Log (UFC/g) de Levaduras

Una vez analizado lo anterior, Taguchi propone condiciones de operación óptimas, con la finalidad de obtener un producto de acuerdo a lo establecido con un % de Humedad menor al 6%, $a_w < 0.60$ y al menos un contenido de 10^6 UFC/g (6 Log UFC/g) de microorganismos probióticos. Estos niveles de operación seleccionados se presentan en la Tabla 3.46:

Tabla 3.46 Factores y niveles óptimos para la liofilización de la microbiota de Kéfir

Variable de respuesta	Factor		
	X ₁	X ₂	X ₃
%X	Nivel 3		Nivel 2
a_w	Nivel 1		
Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas		Nivel 3	
Log (UFC/g) de levaduras		Nivel 3	

Los niveles óptimos seleccionados para estos parámetros fueron: temperatura del aire de entrada (X₁): 145°C h, % de maltodextrina (X₂): 40% y temperatura de aire de salida (X₃): 75°C.

3.10.1 Validación de las condiciones óptimas del proceso de secado por aspersión del Kéfir

Una vez obtenidos los parámetros de operación recomendados por el análisis Taguchi, se procedió a validar las condiciones propuestas bajo los factores y niveles recomendados en la Tabla 3.46, dando como resultado las variables de respuesta indicadas en la Tabla 3.47.

Tabla 3.47 Resultados de la validación experimental del proceso de secado por liofilización de la microbiota de Kéfir

Variables de entrada	Parámetros	Respuesta
	% X	4.32 %
X ₁ : Temperatura del aire de entrada (°C): 145°C	a _w	0.467
	ΔE	20.85
X ₂ : Concentración de maltodextrina (% M): 40%	% acidez	21.37
	Log (UFC/g) de bacterias ácido lácticas	7.8
X ₃ : Temperatura del aire de salida (°C) 75°C:	Log (UFC/g) de levaduras	7.9

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al término de esta investigación se puede concluir que; en el proceso de fermentación, la temperatura y el tiempo de fermentación tienen un efecto significativo y sobre el pH y el % de sólidos del Kéfir, presentando un mayor decremento a temperatura de 26°C. no obstante parámetros de color como *L*, *a* y *b* no fueron afectados significativamente por la temperatura de fermentación pero la ΔE si fue influenciadas por el tiempo, obteniendo una máxima ΔE de 4.91 en un tiempo de 9h a 26° C. La temperatura y el medio de cultivo utilizado fueron variables significativas en la obtención de la microbiota del kéfir, teniendo un incremento mayor a una temperatura de 26°C. La reproducción de la microbiota puede ser maximizada al utilizar un medio de cultivo específico como, la leche con grasa vegetal rehidratada y ultra pasteurizada, sin que exista una diferencia significativa con otras marcas de características similares. la alta tasa de viabilidad microbiana que presenta esta microbiota (valores superiores 8 ciclos logarítmicos UFC/g) de bacterias ácido lácticas y levaduras), lo que la hizo una biomasa capaz de ser sometida al secado por liofilización sin la necesidad del uso de materiales de pared.

Los resultados obtenidos del diseño de experimentos ortogonal $L_{16}4^4$ en el secado por liofilización fueron analizado mediante el cambio máximo en el rango y ANOVA de una sola vía los cuales, mostraron que el tiempo de liofilización tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en las variables de respuesta como la humedad y la actividad de agua, y la presión tuvo un efecto significativo en la diferencia de color y supervivencia de los microorganismos probióticos como las bacterias ácido lácticas y levaduras. Para la obtención de un producto con características idóneas se recomienda parámetros de operación; tiempo de congelamiento 3 h, temperatura de congelamiento -60°C, presión 0.6 mbar y tiempo de liofilización de 15 h. con la finalidad de obtener un producto con: $RCM < 5\%$, $a_w < 0.15$, 8.5 Log (UFC/g) BAL y 8.6 Log (UFC/g) Levaduras, las cuales son condiciones fisicoquímicas y microbiológicas adecuadas como alimento funcional para el mercado. En el estudio del almacenamiento de la microbiota de Kéfir, se determinó que el producto debe ser almacenado a una temperatura de 4°C, en bolsas de aluminio durante un periodo no mayor a 3 meses; aunque el producto presento características dentro del límite permisible hasta los 120 días que duro el experimento.

Los resultados obtenidos en el secado por aspersion del diseño de experimentos ortogonal L_93^3 fueron analizado mediante el cambio máximo en el rango y ANOVA de una sola vía los cuales, mostraron que la temperatura de salida influyo significativamente a los resultados experimentales del % de humedad de la muestra y que el % de maltodextrina ($p < 0.05$) en las variables de respuesta como la actividad de agua, la diferencia de color y supervivencia de los microorganismos probióticos como las bacterias ácido lácticas y levaduras, lo que demuestra el papel tan importante del material de pared para la encapsulación del producto y protegerlo de daños estructurales. Para la obtención de un producto con características apropiadas se recomiendan parámetros de operación tales como: temperatura del aire de entrada: 145°C , concentración de maltodextrina: 40% y una temperatura del aire de salida de 75°C .

Finalmente se puede concluir que, mediante la metodología planteada se puede obtener un producto viable a partir de la microbiota de Kéfir con características probióticas idóneas, para ser utilizado como un cultivo iniciador a gran escala; también presente su utilidad al poder ser adicionado como complemento o fortificante en la elaboración de distintos alimentos o suplementos alimenticios en la industria alimentaria.

También al término de este estudio se recomienda utilizar en el secado por liofilización, microbiota con alta viabilidad; que le permita, soportar el estrés al que se verá sometida bajo las condiciones de operación planteadas y para mejorar la estabilidad de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento la adición de agentes protectores en el secado por liofilización.

REFERENCIAS

- Abadias, M., Benabarre, A., Teixidó, N., Usall, J., & Viñas, I. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, *65*(3), 173–182.
- Acar, B., Sadikoglu, H., & Ozkaymak, M. (2011). Freeze drying of saffron (*crocus sativus* L.). *Drying Technology*, *29*(14), 1622–1627.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2011.590263>
- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B. R., & Troung, V. (2004). Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: Experiments and modelling. *Journal of Food Engineering*, *62*(1), 53–68. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00171-7)
- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B. R., & Truong, V. (2003). Characterization of the surface stickiness of fructose-maltodextrin solutions during drying. *Drying Technology*, *21*(1), 17–34. <https://doi.org/10.1081/DRT-120017281>
- Affane, A. L. N., Fox, G. P., Sigge, G. O., Manley, M., & Britz, T. J. (2011). Simultaneous prediction of acidity parameters (pH and titratable acidity) in Kefir using near infrared reflectance spectroscopy. *International Dairy Journal*, *21*(11), 896–900.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.04.016>
- AFRC, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, *66*(5), 365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- Agrawal, R. (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, *19*(3), 227–246. <https://doi.org/10.1080/08905430500316474>
- Ahmed, N., Singh, J., Chauhan, H., Anjum, P. G. A., & Kour, H. (2013). Different Drying Methods : Their Applications and Recent Advances Different Drying Methods : Their Applications and Recent Advances. *International Journal of Food Nutrition and Safety*, *4*(1), 33–42.
- Anandharamakrishnan, C., & Padma Ishwarya, S. (2015). *Spray drying technique for food ingredient encapsulation*. <https://doi.org/10.1002/9781118863985>
- Arai, S. (1996). Studies on Functional Foods in Japan—State of the Art. *Bioscience*,

-
- Biotechnology, and Biochemistry*, 60(1), 9–15. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.9>
- Araya, M., Morelli, L., Reid, G., Sanders, M. E., Stanton, C., Pineiro, M., & Ben Embarek, P. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, 1–11.
- Arslan, S. (2015). A review: Chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CYTA - Journal of Food*, 13(3), 340–345. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.981588>
- Ashwell, M. (2004). ILSI Europe: Conceptos sobre los alimentos funcionales. In *ILSI Europe concise Monograph series*. [https://doi.org/ISBN 1-57881-157-0](https://doi.org/ISBN%201-57881-157-0)
- Atalar, I., & Dervisoglu, M. (2015). Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using the response surface methodology. *LWT Food Science and Technology*, 60, 751–757. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2803-5>
- Badii M, Castillo M, wong P, V. (2007). Diseños experimentales e investigación científica. *InnOvaciOnes de NegOciOs*, 4(2), 283–330. <https://doi.org/1665-9627>
- Badui, D. S. (2006). Summary for Policymakers. In *Química de los alimentos*.
- Badui Dergal, S. (2006). Química de los alimentos. In *Química de los alimentos* (Cuarta). México: Pearson Educación.
- Barbosa-Canovas, Gustavo V. Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2014). Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality. In *Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bielecka, M., & Majkowska, A. (2000). Effect of spray drying temperature of yoghurt on the survival of starter cultures, moisture content and sensoric properties of yoghurt powder. *Nahrung - Food*, 44(4), 257–260. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20000701\)44:4<257::AID-FOOD257>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20000701)44:4<257::AID-FOOD257>3.0.CO;2-E)
- Boss, E. A., Filho, R. M., & Vasco de Toledo, E. C. (2004). Freeze drying process: real time model and optimization. *Chemical Engineering and Processing*, 43(12), 1475–1485. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2004.01.005>

- Bottazzi, V. (1980). A Note on Scanning Electron Microscopy of Micro-organisms associated with the Kefir Granule. *Journal of Applied Bacteriology*, 48, 265–268.
- Bourrie, B. C. T., Willing, B. P., & Cotter, P. D. (2016). The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00647>
- Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14(5), 375–387. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.08.008>
- Capela, P., Hay, T. K. C., & Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.07.007>
- Celis, M., & Juárez, D. (2009). *Seminario de procesos fundamentales físico-químicos y microbiológicos. Laboratorio de química*. (F. R. B. B. Laboratorio de química, ed.). Retrieved from <http://es.scribd.com/doc/22412571/eq-7-Microbiologia-de-la-leche#scribd>
- Champagne, C. P., Mondou, F., Raymond, Y., & Roy, D. (1996). Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Research International*, 29(5–6), 555–562. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)00050-x](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)00050-x)
- Chandan, R. C., & Kilara, A. (2013). Manufacturing yogurt and fermented milks. In *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks*. <https://doi.org/10.1002/9780470277812>
- Chaux, M. A., Jimenez, L. M., Motato, K., & Hernández, G. (2014). Secado por aspersión y su efecto sobre la viabilidad de los microorganismos presentes en suero fermentado con gránulos de kéfir. *Anais Do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 1–7. <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-0503-25202-150191>
- Chen, K. N., Kuo, C. Y., Shiu, J. S., & Chen, M. J. (2010). Process optimization for a novel kefir candy with high probiotic viability. *Journal of Food Process Engineering*, 34(2), 427–443. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2009.00367.x>

- Chouvenc, P., Vessot, S., Andrieu, J., & Vacus, P. (2004). Optimization of the Freeze-Drying Cycle: A New Model for Pressure Rise Analysis. *Drying Technology*, 22(March 2015), 1577–1601. <https://doi.org/10.1081/DRT-200025605>
- Chua, K. J., Mujumdar, A. S., Chou, S. K., Hawlader, M. N. ., & Ho, J. C. (2000). Convective Drying of Banana, Guava and Potato Pieces : Effect of Cyclical Variations of Air Temperature on Drying Kinetics and Color Change. *Drying Technology*, 18(4–5), 907–936. <https://doi.org/10.1080/07373930008917744>
- Chutrtong, J. (2015). Survival of Probiotic Bacteria in Freeze - Dry Yogurt Starter Cultures Storage at 4 and 30 Degree Celsius. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 191, 2219–2225. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2015.04.514>
- Costa, C., Lucera, A., Lacivita, V., Saccotelli, M. A., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2016). Packaging optimisation for portioned Canestrato di Moliterno cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 69(3), 401–409. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12275>
- Cui, X. H., Chen, S. J., Wang, Y., & Han, J. R. (2013). Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 349–352. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.043>
- Daneshvar, N., Khataee, A. R., Rasoulifard, M. H., & Pourhassan, M. (2007). Biodegradation of dye solution containing Malachite Green: Optimization of effective parameters using Taguchi method. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1–2), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.016>
- Dehnad, D., Jafari, S. M., & Afrasiabi, M. (2016). Influence of drying on functional properties of food biopolymers: From traditional to novel dehydration techniques. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 116–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.002>
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 43–53. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>
- Diplock AT, Agget PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, R. M. (1999). Scientific Concepts of

- Functional Foods in Europe Consensus Document. *British Journal of Nutrition*, 81(04), S1–S27. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000471>
- Dominguez, G. K., Cruz, G. A. E., González, M. H., Gómez, R. L. C., García-Garibay, M., & Rodríguez, S. G. M. (2014). El efecto antihipertensivo de las leches fermentadas. *Revista Argentina de Micrología*, 46(1), 58–65. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70050-1](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70050-1)
- Domínguez, I. L., Azuara, E., Vernon-Carter, E. J., & Beristain, C. I. (2007). Thermodynamic analysis of the effect of water activity on the stability of macadamia nut. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.012>
- Duan, X., Yang, X., Ren, G., Pang, Y., Liu, L., & Liu, Y. (2016). Technical aspects in freeze-drying of foods. *Drying Technology*, 34(11), 1271–1285. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1099545>
- Durán-Jiménez, G., Hernández-Montoya, V., Montes-Morán, M. A., Bonilla-Petriciolet, A., & Rangel-Vázquez, N. A. (2014). Adsorption of dyes with different molecular properties on activated carbons prepared from lignocellulosic wastes by Taguchi method. *Microporous and Mesoporous Materials*, 199, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2014.08.013>
- Durance, T. (2002). Handbook of Food Preservation. *Food Research International*, 35(4), 409. [https://doi.org/10.1016/s0963-9969\(00\)00143-5](https://doi.org/10.1016/s0963-9969(00)00143-5)
- Erdogan, F. S., Ozarslan, S., Sydim, Z. B. G., & Tas, T. K. (2018). The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. *Food Research International*, 115, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.080>
- Farnworth, E. (1999). Kefir: From Folklore to Regulatory Approval. *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods*, 1(February), 57–68. <https://doi.org/10.1300/J133v01n04>
- Farnworth, E. R., & Champagne, C. P. (2010). Production of Probiotic Cultures and Their Incorporation into Foods. In *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00020-4>

- Fellows, P. (2000). Water Activity. In *Food Processing Technology. Principles and Practice*. (Second). Cambridge England: Woodhead Publishing Limited.
- Fellows, P. J. (2000). *Food Processing Technology: Principles and Practice* (Second edi). Retrieved from http://www.webpal.org/SAFE/aaarecovery/2_food_storage/Food Processing Technology.pdf%0Ahttps://books.google.com/books?id=w6nJo2ZUi4MC&pgis=1
- Fernández, E. G., Fernández, M., Pérez, I., Morón, Y., García, V., Perdomo, I., & Pérez S., N. (2008). Diseños de experimentos en tecnología y control de los medicamentos Experimental designs in pharmaceutical technology and control of medicaments. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(2), 28–40.
- Foltz, M., Meynen, E. E., Bianco, V., Platerink, C. Van, & Koning, T. M. M. G. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotripeptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *The Journal of Nutrition*, 137(4), 953–958. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jn/137.4.953>
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. *Probiotics*, 1–8. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_1
- García, F. C. M., Martíñez, S., Franco, I., & Carballo, J. (2006). Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16(7), 762–767. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.07.004>
- Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Kevin Collins, J., Fitzgerald, G., ... Stanton, C. (2002). A spray-dried culture for probiotic Cheddar cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 12(9), 749–756. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00072-9)
- Garibay, M. G., Ramirez, R. Q., & Canalles, A. L. M. (2004). *Biotecnología Alimentaria-Libro.pdf* (G. Noriega, ed.). México, D.F.: Editorial Limusa.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., ... Clementi, F. (2015). Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology*, 49(1), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.017>

- Garrote, G. L., Abraham, A. G., DeAntoni, G. L., & De Antoni, G. L. (1997). Preservation of kefir grains, a comparative study. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 30(1), 77–84. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0135>
- Garrote, Graciela L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (1998). Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *Journal of Dairy Research*, 65(1), 149–154. <https://doi.org/10.1017/S0022029997002677>
- Garrote, Graciela L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68(4), 639–652. <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>
- Gaware, V., Kotade, K., Dolas, R., Dhamak, K., Somwanshi, S., Nikam, V., ... Gaware, V. M. (2011). The magic of kefir: a review. *Pharmacologyonline*, 1, 376–386.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Gill, H. S., & Guarner, F. (2004). *Probiotics and human health : a clinical perspective*. 80, 516–526. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.008664>
- Golowczyc, M. A., Silva, J., Abraham, A. G., De Antoni, G. L., & Teixeira, P. (2010). Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. *Letters in Applied Microbiology*, 50(1), 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02759.x>
- González, E. B. ., Martínez, O. L. A., & Rutiaga, Q. O. M. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(2), 180–192.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. de A. F., & Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>
- Gutiérrez, P. H., & De la Vara, S. R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda). México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C.V.
- Heller, K. J. (2001). *Probiotic bacteria in fermented foods : product characteristics and*.

73(2), 374–379.

Heng, D., Lee, S. H., Ng, W. K., & Tan, R. B. (2011). The nano spray dryer B-90. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(7), 965–972.

<https://doi.org/10.1517/17425247.2011.588206>

Hernández, A. B., La, M. D. E., Guillon, P. A. Z., & García, L. A. (2015). La metodología de Taguchi en el control estadístico de la calidad. *Revista de La Escuela de Perfeccionamiento En Investigación Operativa*, 23(37), 65–83.

Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, 103(5), 582–587. <https://doi.org/10.1053/jada.2003.50111>

Huang, H., Cheng, G., Chen, L., Zhu, X., & Xu, H. (2009). Lead (II) Removal from Aqueous Solution by Spent *Agaricus bisporus*: Determination of Optimum Process Condition Using Taguchi Method. *Water, Air, and Soil Pollution*, 203(1–4), 53–63. <https://doi.org/10.1007/s11270-009-9991-1>

Huang, S., Vignolles, M. L., Chen, X. D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 63, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>

Hymavathi, T. V., & Khader, V. (2005). Carotene, ascorbic acid and sugar content of vacuum dehydrated ripe mango powders stored in flexible packaging material. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(2–3), 181–192. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.03.028>

Ilzarbe, I. L., Martín, T., Elisabeth, V., & Alvarez, S.-A. M. J. (2007). *El diseño de experimentos como herramienta para la mejora de los procesos. Aplicación de la metodología al caso de una catapulta*. 10(20), 127–138. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/2570/257021012011.pdf>

Jangam, S. V. (2011). An overview of recent developments and some R&D challenges related to drying of foods. *Drying Technology*, 29(12), 1343–1357. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.594378>

Jáuregui-lobera, I., & Oliveras, L. M. de J. (2018). Información no es conocimiento : a

- propósito de los alimentos funcionales. *Jonnpr*, 3(8), 593–613.
<https://doi.org/10.19230/jonnpr.2517>
- Ji, L., Si, Y., Liu, H., Song, X., Zhu, W., & Zhu, A. (2014). Application of orthogonal experimental design in synthesis of mesoporous bioactive glass. *Microporous and Mesoporous Materials*, 184, 122–126.
<https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2013.10.007>
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J., & Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products : their role as functional foods. *Meat Science*, 59, 5–13.
[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00053-5)
- Jiménez, M., Flores-Andrade, E., Pascual-Pineda, L. A., & Beristain, C. I. (2015). Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules. *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 346–351. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.050>
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., & Petersen, M. A. (2003). Light-induced colour and aroma changes in sliced, modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13(2–3), 239–249. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00156-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00156-5)
- Kesenkaş, H., Gürsoy, O., & Özbaş, H. (2017). Kefir. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, 339–361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00014-5>
- Khanna, N., & Davim, J. P. (2015). Design-of-experiments application in machining titanium alloys for aerospace structural components. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 61, 280–290.
<https://doi.org/10.1016/j.measurement.2014.10.059>
- Kneifel, W., Ulberth, F., & Schaffer, E. (1992). Tristimulus colour reflectance measurement of milk and dairy products. *Le Lait*, 72(4), 383–391.
<https://doi.org/10.1002/tera.1420210220>
- Kök Taş, T. (2015). Effect of storage parameters on freeze-dried kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 68(3), 434–440. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12196>
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides : From science to applications.

- Journal of Functional Foods*, 1(2), 177–187. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.01.007>
- Lanchero, O., Velandia, G., Fischer, G., Varela, N. C., & García, H. (2007). Comportamiento de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en poscosecha bajo condiciones de atmósfera modificada activa. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1), 61. https://doi.org/10.21930/rcta.vol8_num1_art:84
- Lewicki, P. P., & Duszczek, E. (1998). Color change of selected vegetables during convective air drying. *International Journal of Food Properties*, 1(3), 263–273. <https://doi.org/10.1080/10942919809524582>
- Li, C., Wang, Y., Li, Q., & Xu, N. (2012). Yogurt Starter Obtained from *Lactobacillus plantarum* by Spray Drying. *Drying Technology*, 30(15), 1698–1706. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.714824>
- Liu, J.-R., Wang, S., Lin, Y., & Lin, C. (2002). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, 44(2), 183–187. <https://doi.org/10.1207/S15327914NC4402>
- Liu, J., Wang, S., Chen, M., Chen, H., Yueh, P., & Lin, C. (2006). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. 95, 939–946. <https://doi.org/10.1079/BJN20061752>
- Liu, Y., Zhao, Y., & Feng, X. (2008). Exergy analysis for a freeze-drying process. *Applied Thermal Engineering*, 28(7), 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2007.06.004>
- Luna-Solano, G., Salgado-Cervantes, M. A., Rodríguez-Jimenes, G. C., & García-Alvarado, M. A. (2005). Optimization of brewer's yeast spray drying process. *Journal of Food Engineering*, 68(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.019>
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.010>
- Magalhães, K. T., Pereira, M. A., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J. A.,

- ... Schwan, R. F. (2010). Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, *101*(22), 8843–8850.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.083>
- Man, C. D., & Jones, A. A. (2000). Shelf-life Evaluation of Foods. In *International Journal of Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.0530b.x>
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligné, B., ... Hutkins, R. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, *44*, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>
- Marsh, K., & Bugusu, B. (2007). Food packaging - Roles, materials, and environmental issues: Scientific status summary. *Journal of Food Science*, *72*(3).
<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>
- Marshall, V. M., Cole, W. M., & Brooker, B. E. (1984). Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, *57*(3), 491–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb01415.x>
- Martines, E., & Lira, L. (2010). Análisis y aplicacion de las expresiones del contenido de humedad en sólidos. *Centro de Metrologia*, 1–6. Retrieved from
<https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp01b.pdf>
- Mcfarland, L. V. (2006). *Meta-Analysis of Probiotics for the Prevention of Antibiotic Associated Diarrhea and the Treatment of Clostridium difficile Disease*. (6), 812–822.
<https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00465.x>
- Messina, V., Pieniazek, F., & Sancho, A. (2016). Effect of different freeze drying cycle in *Semimembranous* and *Gluteus Medius* bovine muscles: changes on microstructure, colour, texture and physicochemical parameters. *International Journal of Food Science & Technology*, *51*(5), 1268–1275. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13082>
- Milić, J. K., Petrinić, I., Goršek, A., & Simonič, M. (2014). Ultrafiltration of oil-in-water emulsion by using ceramic membrane: Taguchi experimental design approach. *Central European Journal of Chemistry*, *12*(2), 242–249.
<https://doi.org/10.2478/s11532-013-0373-6>

- Mishra, P., Mishra, S., & Mahanta, C. L. (2014). Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. *Food and Bioproducts Processing*, 92(3), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.003>
- Mitra, A. (2011). The Taguchi method. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3(5), 472–480. <https://doi.org/10.1002/wics.169>
- Miyamoto-Shinohara, Y., Imaizumi, T., Sukenobe, J., Murakami, Y., Kawamura, S., & Komatsu, Y. (2000). Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiology*, 41(3), 251–255. <https://doi.org/10.1006/cryo.2000.2282>
- Montes, E. J., De Paula, C., & Ortega, F. A. (2007). Determinación de las condiciones optimas de encapsulamiento por co-cristalización de jugo de maracuyá (*Passiflora edulis*). *Temas Agrarios*, 12(1), 5–12.
- Montgomery, D. C. (2012). Design and Analysis of Experiments Eighth Edition. In *Design* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1198/tech.2006.s372>
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Morgan, C. A., & Vesey, G. (2009). Freeze-Drying of Microorganisms. *Encyclopedia of Microbiology*, 162–173.
- Mosavian, M. T. H., & Hassani, A. (2010). Making oil-in-water emulsions by ultrasound and stability evaluation using Taguchi method. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 31(3), 293–298. <https://doi.org/10.1080/01932690903123858>
- Motta-Delgado, P. A., Rivera, M. M. S., Duque, T. J. A., & Guevara, F. A. (2014). Factores inherentes a la calidad de la leche en la agroindustria alimentaria. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 6(1), 223. <https://doi.org/10.24188/recia.v6.n1.2014.265>
- Mujumdar, A. S. (2006). *Principles, Classification and Selection of Dryers*. Handbook of industrial drying.
- N'Guessan, F. K., Coulibaly, H. W., Alloue-Boraud, M. W. A., Cot, M., & Djè, K. M. (2016).

- Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 34–41. <https://doi.org/10.1002/fsn3.256>
- Nale, Z., Tontul, I., Aşçi Arslan, A., Sahin Nadeem, H., & Kucukcetin, A. (2017). Microbial viability, physicochemical and sensory properties of kefir microcapsules prepared using maltodextrin/Arabic gum mixes. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 61–72. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12402>
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., & Ünlü, G. (2014). Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3–4), 123–135. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9168-0>
- Nireesha, G., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjan Babu, M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/Freeze Drying -An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 87–98.
- Orrego, A. C. E. (2017). Congelación y Liofilización de alimentos. In *Drying Technology* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>
- Orrego Alzate, C. e. (2008). Congelación y Liofilización de alimentos. In *Gobernación de Caldas* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53836-9.00026-8>
- Ospina Meneses, S., & Cartagena Valenzuela, J. (2008). La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 5(2), 112–123.
- Otles, S. (2003). *Kefir : A Probiotic Dairy-Composition , Nutritional and Therapeutic Aspects* *Kefir : A Probiotic Dairy-Composition , Nutritional and Therapeutic Aspects*. 2(2), 54–59. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.54.59>
- Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), 54–59. <https://doi.org/10.3923/pjn.2003.54.59>
- Panesar, P. S. (2011). *Fermented Dairy Products : Starter Cultures and Potential Nutritional Benefits*. 2011(January), 47–51. <https://doi.org/10.4236/fns.2011.21006>
- Papapostolou, H., Bosnea, L. A., Koutinas, A. A., & Kanellaki, M. (2008). Fermentation efficiency of thermally dried kefir. *Bioresource Technology*, 99(15), 6949–6956.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.026>

- Papavasiliou, G., Kourkoutas, Y., Rapti, A., Sipsas, V., Soupioni, M., & Koutinas, A. A. (2008). Production of freeze-dried kefir culture using whey. *International Dairy Journal*, 18(3), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.09.005>
- Parra, R. A. (2010). Revisión : Microencapsulación de Alimentos. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 63(2), 5669–5684. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000300004>
- Parry, R. T. (Ed). (2012). *Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods*. Springer Science+Business Media, LLC.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Passot, S., Tréléa, I. C., Marin, M., Galan, M., Morris, G. J., & Fonseca, F. (2009). Effect of Controlled Ice Nucleation on Primary Drying Stage and Protein Recovery in Vials Cooled in a Modified Freeze-Dryer. *Journal of Biomechanical Engineering*, 131(7), 074511. <https://doi.org/10.1115/1.3143034>
- Pathare, P. B., Opara, U. L., & Al-Said, F. A. J. (2012). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 6(1), 36–60. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0867-9>
- Peighambardoust, S. H., Golshan Tafti, A., & Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 22(5), 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.01.009>
- Perera, C. O. (2005). Selected quality attributes of dried foods. *Drying Technology*, 23(4), 717–730. <https://doi.org/10.1081/DRT-200054180>
- Perussello, C. A., Mariani, V. C., & Amarante, A. C. C. Do. (2013). Thermophysical properties of okara during drying. *International Journal of Food Properties*, 17(4), 891–907. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.628430>
- Pisano, R., Fissore, D., Velardi, S. A., & Barresi, A. A. (2010). In-line optimization and control of an industrial freeze-drying process for pharmaceuticals. *Journal of*

- Pharmaceutical Sciences*, 99(11), 4691–4709. <https://doi.org/10.1002/jps.22166>
- Placido, M., & Aleman M.P. (2002). *Método higrométrico rápido para determinar actividad del agua*. 3(4), 229–235.
- Plessas, S., Alexopoulos, A., Voidarou, C., Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2011). Microbial ecology and quality assurance in food fermentation systems. The case of kefir grains application. *Anaerobe*, 17(6), 483–485. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.014>
- Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., & Samaržija, D. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, 63(1), 3–14.
- Pu, H., Li, Z., Hui, J., & Raghavan, G. S. V. (2016). Effect of relative humidity on microwave drying of carrot. *Journal of Food Engineering*, 190, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.06.027>
- Quek, S. Y., Chok, N. K., & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.020>
- Quintana, G., Gerbino, E., & Gómez-Zavaglia, A. (2017). Okara: A nutritionally valuable by-product able to stabilize lactobacillus plantarum during freeze-drying, spray-drying, and storage. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00641>
- Ratray, F. P., & O'Connell, M. J. (2011). *Microbial Aspects of Kefir Grains and Kefir*. 518–524.
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grzeškowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82–96. <https://doi.org/doi:10.1017/S0954422416000275>
- Sadikoglu, H., Ozdemir, M., & Seker, M. (2006). Freeze-drying of pharmaceutical products: Research and development needs. *Drying Technology*, 24(7), 849–861. <https://doi.org/10.1080/07373930600734018>
- Sadler, D. G., & Murphy, A. P. (2010). pH and Titratable Acidity. In *Food Analysis* (pp. 219–238). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1478-1>

- Sahin, S., & Gülüm, S. S. (2006). Electromagnetic Properties. In *Physical Properties of Foods* (pp. 157–192). https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0054-8_6
- Sahin, S., & Sumnu, S. G. (2007). Thermal Properties of Foods. *Physical Properties of Foods*, 107–155. https://doi.org/10.1007/0-387-30808-3_3
- Salvatore, R. (2014). *Optimización del desempeño funcional de los sacos De polipropileno mediante el diseño experimental de Taguchi*. 33(2). Retrieved from <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/7964/3/CD-4858.pdf>
- Samona, A., & Robinson, R. K. (1991). Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 44(3), 64–66. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1991.tb00639.x>
- Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. T. (2013). Short communication: Peptide profiling in cheeses packed using different technologies. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3551–3557. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6302>
- Sánchez, B., De los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., & Gueimonde, M. (2009). *Probiotic fermented milks : Present and future*. 62(4), 472–483. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00528.x>
- Sanez Falcón Lida Carmen. (2012). *Fisico Quimica De Alimentos*. Perú.
- Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Mata-Haro, V., Vallejo-Cordoba, B., & González-Cordova, A. (2015). *The effects of consuming probiotic-fermented milk on the immune system : A review of scientific evidence*. 67, 1–13. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12202>
- Santillán-Urquiza, E., Méndez-Rojas, M., & Vélez, R. J. F. (2014). Productos lácteos funcionales, fortificados y sus beneficios en la salud humana. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 5–14.
- Sanz, Y., & Dalmau, J. (2008). Los probióticos en el marco de la nueva normativa europea que regula los alimentos funcionales. *Acta Pediátrica Espanola*, 66(1), 27–31.
- Sarkar, S. (2007). Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, 109(4), 280–290. <https://doi.org/10.1108/00070700710736534>

- Sarkar, S. (2008). Biotechnological innovations in kefir production: A review. *British Food Journal*, 110(3), 283–295. <https://doi.org/10.1108/00070700810858691>
- Schoug, Å., Olsson, J., Carlfors, J., Schnürer, J., & Håkansson, S. (2006). Freeze-drying of *Lactobacillus coryniformis* Si3-effects of sucrose concentration, cell density, and freezing rate on cell survival and thermophysical properties. *Cryobiology*, 53(1), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.04.003>
- Searles, J. A., Aravapalli, S., & Hodge, C. (2017). Effects of Chamber Pressure and Partial Pressure of Water Vapor on Secondary Drying in Lyophilization. *AAPS PharmSciTech*, 18(7), 2808–2813. <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0768-3>
- Sekkal-Taleb, N. (2016). Chemical and microbiological composition of Kefir and its natural benefits. *Mediterranean Journal of Biosciences*, 1(4), 174–183.
- Serafini, F., Turroni, F., Ruas-Madiedo, P., Lugli, G. A., Milani, C., Duranti, S., ... Ventura, M. (2014). Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.024>
- Seydim, A. C., Greene, A. K., & Guzel-Seydim. (2000). Organic Acids and Volatile Flavor Components Evolved During Refrigerated Storage of Kefir 1. *Journal of Dairy Science*, 83(2), 275–277. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74874-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74874-0)
- Shah, N. P., Lankaputhra ., W. E. V., Britzb, M. L., & William, S. A. K. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Commercial Yoghurt During Refrigerated Storage. *International Dairy Journal*, 5, 515–521. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00028-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00028-2)
- Shirley, F. (2016). Efecto del contenido de grasa y la temperatura en las características de sorción de la leche en polvo. *Departamento de Procesos Biológicos y Bioquímicos*, (June 2015). <https://doi.org/10.1007/s10114-005-0625-2>
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., & Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000186>

- Singh, P. K., & Shah, N. P. (2017). Other fermented dairy products: Kefir and koumiss. In Academic Press (Ed.), *Yogurt in Health and Disease Prevention*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805134-4.00005-5>
- Smith, J. P., Daifas, D. P., El-Khoury, W., Koukoutsis, J., & El-Khoury, A. (2004). Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *44*(1), 19–55. <https://doi.org/10.1080/10408690490263774>
- Sosnik, A., & Seremeta, K. P. (2015). Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, *223*, 40–54.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.05.003>
- Su, Y., Zhang, M., & Mujumdar, A. S. (2015). Recent Developments in Smart Drying Technology. *Drying Technology*, *33*(3), 260–276.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2014.985382>
- Tapia, M. S., Alzamora, S. M., & Chirife, J. (2008). Effects of Water Activity (aw) on Microbial Stability: As a Hurdle in Food Preservation. In *Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications*. <https://doi.org/10.1002/9780470376454.ch10>
- Teijeiro, M., Pérez, P. F., De Antoni, G. L., & Golowczyc, M. A. (2018). Suitability of kefir powder production using spray drying. *Food Research International*, *112*, 169–174.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.023>
- Tejeda, A. M. (2018). *La humedad en la atmósfera*. Retrieved from http://nimbus.com.uy/weather/Cursos/Curso_2006/Textos/complementarios/Meteorologia_descriptiva_Inzunza/cap5_Inzunza_Humedad.pdf
- Temiz, H. (2010). Effect Of Modified Atmosphere Packaging On Characteristics Of Sliced Kashar Cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, *34*(5), 926–943.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2009.00431.x>
- Tratnik, L., Božanić, R., Herceg, Z., & Drgalić I. (2006). *The quality of plain and supplemented kefir from goat ' s and cow ' s milk*. *59*(1), 40–46.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, *9*(1), 225–241.

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>

- Tun Norbrillinda, M., Mahanom, H., Nur Elyana, N., & Nur Intan Farina, S. (2016). Optimization of spray drying process of *Sargassum muticum* color extract. *Drying Technology*, 34(14), 1735–1744. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1204550>
- Turkmen, N. (2017). Kefir as a Functional Dairy Product. *Dairy in Human Health and Disease across the Lifespan*, 373–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809868-4.00029-7>
- Tymczyszyn, E. E., Del Rosario Díaz, M., Gómez-Zavaglia, A., & Disalvo, E. A. (2007). Volume recovery, surface properties and membrane integrity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dehydrated in the presence of trehalose or sucrose. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2410–2419. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03482.x>
- Velardi, S. A., & Barresi, A. A. (2008a). Development of simplified models for the freeze-drying process and investigation of the optimal operating conditions. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(1 A), 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2007.10.007>
- Velardi, S. A., & Barresi, A. A. (2008b). Freeze drying for food powder production. *Chemical Engineering Research and Design*, 86, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2007.10.007>
- Villanueva, F. R. (2015). Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos. *Ingeniería Industrial*, 33, 265–275. Retrieved from https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria_industrial/article/viewFile/545/513
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10(4), 271–275. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00045-5)
- Walsh, A. M., Crispie, F., Kilcawley, K., O’Sullivan, O., O’Sullivan, M. G., Claesson, M. J., & Cotter, P. D. (2016). Microbial sucesion and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. *Applied and Environment Science*, 1(5), 1–16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00052-16>

- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2005). *Dairy Science and Technology* (Second). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Webb, G. P. (2006). Functional Foods. In *Dietary Supplements and Functional Foods* (pp. 205–223). Blackwell Publishing Ltd.
- Wisniewski, R. (2015). Spray Drying Technology Review. *45th International Conference on Environmental Systems*, (July), 1–223.
- Witthuhn, R. ., Schoeman T, & TJ, B. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.07.016>
- Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov, G. H., & Tamime, A. Y. (2006). Production of Kéfir, Koumiss and other related products. *Fermented Milks.*, (c), 203–204.
- Wszolek, M., Kupiec-Teahan, B., Skov Guldager, H., & Tamime, A. Y. (2006). Production of Kefir, Koumiss and other related products. *Fermented Milks*, 174–216. <https://doi.org/10.1002/9780470995501.ch8>
- Yáñez Fernández J., Salazar Montoya J. A., Chaires Martínez L., Jiménez Hernández J., Márquez Robles M., & Ramos Ramírez E.G. (2002). Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Mundo Alimentario*, 24–30.
- Zakrys-Waliwander, P. I., O'Sullivan, M. G., O'Neill, E. E., & Kerry, J. P. (2012). The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine M. longissimus dorsi muscle during chilled storage. *Food Chemistry*, 131(2), 527–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.017>
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.),. *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, 3–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1008-0_2