

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE  
MONTERREY  
CAMPUS ESTADO DE MÉXICO



## **ULTRASONIDO EN LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS LÍQUIDOS**

TESIS QUE PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN DESARROLLO SOSTENIBLE  
PRESENTA

**IRMA MAGALY RIVAS SERNA**

Asesor: Dr. Javier Ramírez Angulo

Comité de tesis: M. en C. Ma. Elena Olvera Luna

Jurado:

Presidente: Dr. Ilangovan Kuppusamy Ammal

Secretario: Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Vocal: Dr. Mario Carranza Alvarado

Vocal: Dr. Julio César Botello Pozos

Atizapán de Zaragoza, Estado de México, Marzo de 2007

# DEDICATORIA

A mis padres,  
por su apoyo incondicional

# AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Estado de México, por el apoyo brindado para realizar mis estudios de maestría

Al Centro de Investigación en Calidad Ambiental (CICA) Campus Estado de México, por facilitar y apoyar la realización mediante el préstamo de sus instalaciones y recursos.

A la M. en C. Pilar Bremauntz por su asesoramiento que fue de gran ayuda.

Al Dr. Luis Fernández Linares por su tiempo, sus conocimientos, por siempre ayudarme a buscar opciones y por la orientación brindada para la realización de este trabajo.

A la Dra. Sara E. Valdés y a Ángeles Ruíz por el préstamo de su laboratorio, sus invaluable conocimientos y su paciencia.

A la Dra. Clara Inés Álvarez por apoyarme con material Para la realización de este trabajo y por aconsejarme siempre.

Al Laboratorio de propiedades reológicas y funcionales en alimentos y sus integrantes por permitirme el uso de sus instalaciones

A Tania y Ambey por ayudarme con el trabajo pesado

A Ajax, Fabiola, Olga, Ramiro, Melissa, Manuel, Gaby y Marlon por enseñarme a ver las cosas de diferentes formas

Al Dr. Javier Ramírez Angulo y Ma. Elena Olvera Luna por motivarme a buscar soluciones.

## RESUMEN

En años recientes, la industria alimenticia ha descubierto que las ondas ultrasónicas tienen una extensa variedad de aplicaciones en el procesamiento y evaluación de productos alimenticios. La irradiación ultrasónica tiene el potencial de ser usado para la inactivación de bacterias. Además presenta la ventaja de ser más amigable con el medio ambiente que otras técnicas térmicas convencionales y de minimizar pérdidas de sabores y cambios de color mejorando la calidad nutricional de los alimentos.

El propósito del presente trabajo de investigación, fue evaluar el tiempo de inactivación microbiana en leche expuesta a ondas ultrasónicas de 22 kHz durante diferentes tiempos de aplicación a dos diferentes tipos de cepas patógenas.

Se utilizaron ondas ultrasónicas de alta intensidad a una frecuencia de 22 kHz, para irradiar muestras de leche entera a temperatura ambiente, 40, 50 y 60°C inoculadas con *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*, dentro de un vaso de precipitados con 60 ml de leche. Se aplicaron tratamientos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos para cada tipo de bacteria. A temperatura ambiente no se obtuvo muerte total microbiana, pero el ultrasonido mostró un efecto favorable al combinarse con calor. La destrucción total de *Escherichia coli* fue después de 10 min a 50°C y después de 5 min a 60°C; mientras que para *Staphylococcus aureus*, se reportó su muerte total a los 5 min de tratamiento ultrasónico a 60°C.

El ultrasonido no afectó significativamente ( $\alpha < 0.01$ ) la viscosidad, la densidad, el pH ni el color de la leche. Además se comprobó el principio en que están basados los procesos no convencionales como el ultrasonido de no dañar las proteínas. Los glóbulos de grasa se ven disminuidos en su tamaño, proceso favorable en el procesamiento de la leche ya que induce a la homogenización evitando la aglomeración de la grasa en la superficie.

A partir de este trabajo de tesis acerca del efecto del ultrasonido a 22 kHz de frecuencia puede concluirse que el ultrasonido muestra potencial de convertirse en una alternativa para la conservación de la leche.



# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Objetivo General</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1 Objetivos específicos</b>	<b>16</b>
<b>3. ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Características generales de la leche</b>	<b>18</b>
<b>3.1.1 Definición de la leche</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Estados de dispersión de la leche</b>	<b>18</b>
<b>3.1.3 Composición química de la leche</b>	<b>19</b>
<b>3.1.4 Composición fisicoquímica de la leche</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Microbiología de la leche</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1 Importancia de los microorganismos en los lácteos</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2 Principales grupos de microorganismos que se encuentran en la leche</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2.1 Bacterias Gram positivas</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2.1.1 Bacterias lácticas</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2.1.2 Micrococos</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.1.3 Estafilococos</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.1.4 Bacterias esporuladas</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.2 Bacterias Gram negativas</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.2.1 Enterobacterias</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2.2.2 Pseudomonas</b>	<b>28</b>
<b>3.2.2.2.3 Acromobacteriaceae</b>	<b>28</b>

<b>3.2.2.2.4</b> Bacterias Gram negativas diversas	<b>28</b>
<b>3.2.2.3</b> Mohos y levaduras	<b>29</b>
<b>3.2.2.4</b> Virus	<b>29</b>
<b>3.2.3</b> Enfermedades transmitidas por lácteos	<b>29</b>
<b>3.2.3.1</b> Enfermedades causadas por consumir leche Contaminada	<b>30</b>
<b>3.2.4</b> Microorganismos patógenos de la leche	<b>31</b>
<b>3.2.4.1</b> Características de la especie <i>Escherichia coli</i>	<b>32</b>
<b>3.2.4.1.1</b> Enfermedades por <i>Escherichia coli</i>	<b>32</b>
<b>3.2.4.2</b> Características de la especie <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>34</b>
<b>3.2.4.2.1</b> Intoxicación Estafilocócica Estafiloenterotoxiosis	<b>34</b>
<b>3.3</b> Métodos térmicos de desinfección	<b>35</b>
<b>3.3.1</b> Métodos de pasteurización	<b>37</b>
<b>3.3.1.1</b> Método batch	<b>37</b>
<b>3.3.1.2</b> Método continuo	<b>37</b>
<b>3.3.2</b> Efecto de la pasteurización sobre los componentes de la leche	<b>39</b>
<b>3.4</b> Consumo y suministro de leche	<b>40</b>
<b>3.4.1</b> Consumo de leche a nivel mundial	<b>40</b>
<b>3.4.2</b> Consumo de leche en México	<b>41</b>
<b>3.4.3</b> La industria de alimentos y la sustentabilidad	<b>44</b>
<b>3.4.4</b> Situación de la industria láctea en México	<b>45</b>
<b>3.5</b> Generalidades del ultrasonido	<b>47</b>
<b>3.5.1</b> Concepto del ultrasonido	<b>47</b>
<b>3.5.2</b> Parámetros del ultrasonido	<b>47</b>
<b>3.5.2.1</b> Longitud de onda	<b>48</b>
<b>3.5.2.2</b> Frecuencia	<b>48</b>
<b>3.5.2.3</b> Amplitud	<b>49</b>
<b>3.5.2.4</b> Potencia	<b>49</b>
<b>3.5.2.5</b> Intensidad	<b>49</b>
<b>3.5.2.6</b> Impedancia	<b>50</b>
<b>3.5.2.7</b> Atenuación	<b>50</b>
<b>3.5.3</b> Comportamiento de las ondas ultrasónicas en la leche	<b>51</b>
<b>3.5.4</b> Mecanismos y efectos	<b>52</b>
<b>3.5.4.1</b> Cavitación	<b>52</b>
<b>3.5.4.2</b> Efectos Estructurales	<b>54</b>
<b>3.5.4.3</b> Turbulencia	<b>54</b>
<b>3.5.5</b> ¿Cómo se produce el ultrasonido?	<b>54</b>
<b>3.5.6</b> Usos del ultrasonido en la tecnología de alimentos	<b>55</b>
<b>3.5.6.1</b> Limpieza ultrasónica	<b>55</b>
<b>3.5.6.2</b> Emulsificación	<b>56</b>

3.5.6.3 Efecto enzimático	56
3.5.6.4 Ultrasonido en los procesos de extracción	56
3.5.6.5 Cristalización y enfriamiento	56
3.5.6.6 Filtración y secado	56
3.5.6.7 Estimulación de la actividad en células vivas	58
3.5.6.8 Pruebas de inspección y calidad	58
3.5.6.9 Inactivación de microorganismos	59
3.5.7 Aplicaciones del ultrasonido a alimentos	60
3.5.7.1 Granos	60
3.5.7.2 Carne	61
3.5.7.3 Productos congelados	61
3.5.7.4 Jugos de frutas	61
3.5.7.5 Té	61
3.5.7.6 Jarabe	62
3.5.7.7 Lácteos	62
3.5.7.7.1 Yogurt	62
3.5.7.7.2 Queso	62
3.5.7.7.3 Leche	62
3.5.8 Efectividad del ultrasonido combinado con otras técnicas	63
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>64</b>
4.1 Microorganismos	64
4.2 Muestras de leche	64
4.3 Medios de cultivo	65
4.4 Preparación del inóculo	65
4.5 Inoculación de la leche	66
4.6 Conteo de microorganismos	66
4.6.1 Cuenta en placa	66
4.6.2 Número más probable	67
4.7 Tratamiento ultrasónico de la leche	68
4.8 Tratamiento termoultrasónico de la leche	69
4.9 Evaluación del funcionamiento del equipo de ultrasonido	69
4.10 Obtención de la curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	70
4.11 Determinación rápida de la calidad microbiana de la leche bronca mediante la prueba de azul de metileno	70
4.12 Determinación de color en la leche bronca	71
4.13 Determinación de viscosidad en la leche bronca	71
4.14 Determinación de densidad en la leche bronca	72
4.15 Determinación de tamaño de glóbulo de grasa en la leche Bronca	72
4.16 Determinación de proteína en la leche bronca	73
4.16.1 Electroforesis	73

4.16.2 Tratamiento de la muestra (extracción proteica)	74
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>76</b>
5.1 Evaluación del equipo de ultrasonido	76
5.1.1 Efecto del ultrasonido en el pH y la temperatura en la solución de yoduro de potasio	76
5.2 Efecto del ultrasonido en el pH y la temperatura de la leche	79
5.2.1 Ajuste matemático del efecto del tiempo de irradiación ultrasónica sobre la temperatura	80
5.3 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	82
5.4 Efecto del ultrasonido en la muerte microbiana	84
5.5 Efecto del tratamiento termoultrasónico en la muerte microbiana	87
5.6 Efecto de la termoultrasonificación en la calidad microbiana de la leche bronca	97
5.7 Efecto del ultrasonido sobre la viscosidad y la densidad de la leche bronca	99
5.7.1 Ajuste matemático del efecto del tiempo de irradiación ultrasónica sobre la densidad	101
5.7.2 Ajuste matemático del efecto del tiempo de irradiación ultrasónica sobre la viscosidad	102
5.8 Efecto del ultrasonido sobre el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche bronca	104
5.9 Efecto del ultrasonido sobre el color de la leche bronca	108
5.10 Efecto del ultrasonido sobre las proteínas de la leche bronca	111
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>115</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO A : Análisis estadístico</b>	<b>125</b>
A.1 Análisis estadístico para el comportamiento del ph en la leche	125
A.2 Análisis estadístico para el comportamiento de temperatura en la	125

Leche	
A.3 Análisis estadístico para el comportamiento de densidad en leche	<b>126</b>
A.4 Análisis estadístico para el comportamiento de viscosidad en Leche	<b>126</b>
A.5 Análisis estadístico para la evaluación del color en leche	<b>127</b>
A.6 Análisis estadístico para la disminución de glóbulos de grasa en Leche	<b>127</b>
A.7 Análisis estadístico para el efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> en Leche	<b>128</b>
A.8 Análisis estadístico para el efecto del ultrasonido sobre <i>S. aureus</i> en leche	<b>130</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
<b>3.1</b>	Composición cuantitativa de la leche de vaca	<b>20</b>
<b>3.2</b>	Diferentes cantidades de proteínas presentes en la leche de vaca	<b>20</b>
<b>3.3</b>	Enzimas más importantes de la leche de vaca	<b>21</b>
<b>3.4</b>	Brotos de enfermedades transmitidas por lácteos en México durante el periodo 1993-2002	<b>31</b>
<b>3.5</b>	Signos y síntomas de las enfermedades relacionadas con <i>E. coli</i>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	Consumo anual de productos lácteos en el mundo en 1999	<b>41</b>
<b>3.7</b>	Producción de leche en relación al giro de producción	<b>46</b>
<b>3.8</b>	Consumo de agua diario característico reportado por la industria alimenticia	<b>47</b>
<b>3.9</b>	Principales contaminantes de la industria láctea	<b>47</b>
<b>3.10</b>	Parámetros del ultrasonido en leche y agua	<b>51</b>
<b>3.11</b>	Técnicas de medición de ultrasonido en alimentos	<b>59</b>
<b>5.1</b>	Temperatura de la leche a diferentes tiempos de irradiación ultrasónica a 22 kHz	<b>81</b>
<b>5.2</b>	Modelos ajustables al comportamiento de la temperatura	<b>81</b>
<b>5.3</b>	Efecto de la sonicación y la temperatura en la muerte de <i>Escherichia coli</i>	<b>88</b>
<b>5.4</b>	Efecto de la sonicación y la temperatura en la muerte de <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>88</b>
<b>5.5</b>	Efecto de la termosonicación en el tiempo de reducción decimal o valor D	<b>93</b>
<b>5.6</b>	Comparación del valor k, valor Z y energía de activación entre la termoultrasonicación y tratamientos térmicos	<b>97</b>
<b>5.7</b>	Determinación del número de microorganismos en leche según la prueba de azul de metileno	<b>98</b>
<b>5.8</b>	Prueba de azul de metileno aplicada a leche bronca termoultrasonificada	<b>99</b>
<b>5.9</b>	Resultados de la densidad y viscosidad en leche irradiada por ultrasonido	<b>100</b>
<b>5.10</b>	Modelos ajustables al comportamiento de la densidad	<b>101</b>
<b>5.11</b>	Modelos ajustables al comportamiento de la viscosidad	<b>103</b>
<b>5.12</b>	Disminución del glóbulo de grasa obtenido del tratamiento ultrasónico	<b>105</b>
<b>5.13</b>	Características físicas del color	<b>108</b>
<b>5.14</b>	Resultados de los parámetros de color en la leche	<b>110</b>

<b>5.15</b>	Comparación del peso molecular experimental y teórico de las proteínas de la leche	<b>113</b>
<b>A.1</b>	Análisis de varianza de pH para la clasificación en una dirección	<b>125</b>
<b>A.2</b>	Análisis de varianza de temperatura para la clasificación en una dirección	<b>125</b>
<b>A.3</b>	Análisis de varianza de densidad para la clasificación en una dirección	<b>126</b>
<b>A.4</b>	Análisis de varianza de viscosidad para la clasificación en una dirección	<b>126</b>
<b>A.5</b>	Análisis de varianza de color del parámetro x para la clasificación en una dirección	<b>127</b>
<b>A.6</b>	Análisis de varianza de color del parámetro y para la clasificación en una dirección	<b>127</b>
<b>A.7</b>	Análisis de varianza de homogenización para la clasificación en una dirección	<b>128</b>
<b>A.8</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> al tiempo 1 min para la clasificación en una dirección	<b>128</b>
<b>A.9</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> al tiempo 2 min para la clasificación en una dirección	<b>128</b>
<b>A.10</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> al tiempo 3 min para la clasificación en una dirección	<b>129</b>
<b>A.11</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> al tiempo 4 min para la clasificación en una dirección	<b>129</b>
<b>A.12</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> al tiempo 5 min para la clasificación en una dirección	<b>129</b>
<b>A.13</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>E. coli</i> al tiempo 10 min para la clasificación en una dirección	<b>130</b>
<b>A.14</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>S. aureus</i> al tiempo 3 min para la clasificación en una dirección	<b>130</b>
<b>A.15</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>S. aureus</i> al tiempo 5 min para la clasificación en una dirección	<b>130</b>
<b>A.16</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>S. aureus</i> al tiempo 10 min para la clasificación en una dirección	<b>131</b>
<b>A.17</b>	Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre <i>S. aureus</i> al tiempo 15 min para la clasificación en una dirección	<b>131</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
3.1	Representación esquemática del equilibrio entre las fases dispersas, coloidales y disueltas de la leche	19
3.2	Diagrama de la pasteurización de la leche y su relación con la destrucción de microorganismos y de enzimas	36
3.3	Instalación de pasteurización de intercambio de placas	38
3.4	Producción mundial de leche durante el periodo comprendido entre 1992 y 2001 en millones de toneladas	42
3.5	Producción de leche de bovino en México en millones de litros (1992-2001)	43
3.6	Esquema que representa dos diferentes potencias de ondas ultrasónicas	49
3.7	Generación acústica de la cavitación de burbujas	53
3.8	Diagrama esquemático del ultrasonido en congelación de alimentos	57
4.1	Cepa de <i>E. coli</i>	64
4.2	Cepa de <i>S. aureus</i>	64
4.3	Procedimiento esquemático del tratamiento microbiológico NMP	68
4.4	Equipo de ultrasonido (60 Sonic Dismembrator) con sonotrodo sumergido en una muestra de 60 ml de leche	69
4.5	Representación del viscosímetro Ostwald	72
4.6	Microscopio óptico equipado con cámara fotográfica para la medición de los glóbulos de grasa en leche	73
4.7	Cámara de electroforesis utilizada para la determinación de proteína	74
4.8	Representación esquemática de la separación de capas en la muestra centrifugada con solución salina	74
4.9	Representación esquemática de la separación de capas en la muestra centrifugada con alcohol	75
5.1	Evolución de pH y temperatura para KI 0.06M por irradiación ultrasónica de 22 MHz por tiempos de 0 a 35 min	78
5.2	Evolución de pH y temperatura para leche por irradiación ultrasónica de 22 MHz por tiempos de 0 a 35 min	80
5.3	Gráfica ajustada de la variación de la temperatura en la leche siguiendo el modelo logístico	82
5.4	Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en caldo lactosado biliado verde brillante a 37+1 °C	83



<b>5.5</b>	Curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en caldo nutritivo a $37\pm 1$ °C	<b>84</b>
<b>5.6</b>	Efecto bactericida del ultrasonido sobre <i>Escherichia coli</i>	<b>85</b>
<b>5.7</b>	Efecto bactericida del ultrasonido sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	<b>85</b>
<b>5.8</b>	Curva de sobrevivencia de <i>E. coli</i> a diferentes temperaturas	<b>90</b>
<b>5.9</b>	Curva de sobrevivencia de <i>S. aureus</i> a diferentes temperaturas	<b>90</b>
<b>5.10</b>	Gráfico de supervivencia a una temperatura dada	<b>92</b>
<b>5.11</b>	Gráfico de termodestrucción	<b>95</b>
<b>5.12</b>	Gráfica ajustada de la variación de la densidad en la leche siguiendo el modelo de arreglo polinomial	<b>102</b>
<b>5.13</b>	Gráfica ajustada de la variación de la viscosidad en la leche siguiendo el modelo MMF	<b>104</b>
<b>5.14</b>	Micrografías de muestras de leche sometidas a irradiación ultrasónica durante diferentes tiempos	<b>108</b>
<b>5.15</b>	Diagrama cromático de la CIE representando la luminosidad Y	<b>109</b>
<b>5.16</b>	Diagrama cromático de la CIE en color	<b>111</b>
<b>5.17</b>	Muestra del gel de electroforesis de poliacrilamida de la leche irradiada por ultrasonido	<b>112</b>
<b>5.18</b>	Gráfica de linearización del peso molecular de las proteínas	<b>112</b>
<b>5.19</b>	Diagrama esquemático de los tamaños relativos de un glóbulo de grasa, una bacteria y una micela de caseína	<b>114</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos patógenos en alimentos de consumo humano provoca la generación de enfermedades gastrointestinales que representan un alto riesgo a la salud y bienestar de la comunidad consumidora de los productos contaminados. Las enfermedades provocadas por el consumo de alimentos y agua contaminada son causa de muertes a nivel mundial. Para las enfermedades infecciosas intestinales se registran 4687 defunciones en México durante el año 2002; en un orden de importancia con respecto a otras enfermedades, se encuentran en el lugar 15vo (INEGI, 2003).

La leche es un excelente medio de cultivo, por lo cual está sujeta a alteraciones microbiológicas, por interés humano surge la necesidad de implementar métodos de conservación de la leche que ayuden a eliminar microorganismos patógenos o detener su desarrollo y obtener diferentes productos alimenticios. Entre los métodos térmicos de conservación más comúnmente utilizados en la industria láctea está la pasteurización. El objetivo de la pasteurización es destruir los microorganismos patógenos y la mayoría de los otros microorganismos. El método de pasteurización representa desventajas en términos de cuidado ambiental. Para este proceso se necesita un volumen considerable de agua caliente y agua fría. Para llegar a la temperatura adecuada, es necesario calentar utilizando gran cantidad de energía proveniente de combustibles fósiles que son fuente de contaminación; además de que en algunas centrales donde se procesa este tipo de alimento y se utiliza la pasteurización se tira el agua sin darle algún otro uso.

El ultrasonido es una técnica que resulta efectiva para la eliminación de células vegetales, esporas y enzimas; reduce tiempos de tratamiento, no requiere aumentos drásticos de temperatura y se puede utilizar en procesos batch o continuos, minimizando el consumo de energía.

El ultrasonido podría tener una fuerte presencia en el futuro dentro de la industria alimentaria. El ultrasonido ya ha tenido gran éxito dentro de la industria de alimentos por ejemplo: en la medición del grosor de tuberías, en el grosor de

capas de chocolate, en la detección de contaminantes como: metal, vidrio y madera, medición de flujo volumétrico en tuberías, determinación de compuestos alimentarios. Sin embargo, los investigadores consideran que el mejor de sus campos puede estar en la inactivación de microorganismos aunque se necesita más experimentación antes de que pueda convertirse en un método de conservación.

Es por esto que se considera al ultrasonido como una alternativa para minimizar las limitaciones presentadas por los métodos convencionales, así como un proceso sustentable. En el presente trabajo de investigación se pretende determinar los efectos del ultrasonido sobre los microorganismos contenidos en la leche, así como identificar posibles efectos organolépticos, fisicoquímicos y en su textura.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos de la ultrasonificación en leche como un proceso de destrucción microbiana.

#### **2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar el tiempo óptimo de irradiación ultrasónica para la destrucción de 2 cepas patógenas en la leche.

Determinar la temperatura óptima de termosonicación para la destrucción de 2 cepas patógenas en la leche.

Evaluar la influencia del ultrasonido sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche (color, viscosidad, densidad pH, proteínas).

Evaluar los efectos del ultrasonido sobre la homogenización de la leche.

### 3. ANTECEDENTES

Los alimentos son aquellas sustancias o productos de cualquier naturaleza, que por sus características, aplicaciones, componentes, preparación y estado de conservación, son susceptibles de ser habitual e idóneamente utilizados para la normal nutrición humana (Astiasarán, 2003).

Para el hombre el consumo de alimentos no se reduce a ser un vehículo de nutrientes, sino que va acompañado de otras sensaciones, por lo que es necesario tener propiedades adecuadas de color, sabor, aroma o textura.

Los alimentos, en general, constituyen medios propicios para el crecimiento de los microorganismos que pueden causar su alteración e incluso hacer que sean responsables de infecciones e intoxicaciones. Estos aspectos determinan la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos.

Por lo tanto el estudio del alimento habrá que abordarlo desde diferentes puntos de vista: características generales de la leche, alteraciones microbiológicas, métodos de conservación y alternativas a su conservación.

En el presente estudio de investigación se ha seleccionado la leche como alimento a tratar para evitar o reducir la presencia de microorganismos patógenos.

## 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA LECHE

### 3.1.1 DEFINICIÓN DE LECHE

La leche es uno de los productos naturales más valiosos y es, desde hace milenios, uno de los constituyentes fundamentales de la alimentación humana.

La leche es el líquido segregado por las hembras de los mamíferos a través de las glándulas mamarias cuya finalidad es alimentar a la cría durante un período de tiempo; su importancia se basa en su alto valor nutritivo, ya que sus componentes se encuentran en la forma y en las proporciones adecuadas, de tal manera que cada una de las leches representa el alimento más balanceado y propio para sus correspondientes crías (Badui, 1999).

La leche se puede considerar un líquido blanco y opaco, aunque puede presentar una tonalidad ligeramente amarillenta, sobre todo cuando las vacas se encuentran pastando. Tiene un sabor característico, puro, fresco y ligeramente dulzón, así como un olor igualmente característico y puro, una consistencia homogénea y carece de grumos (Spreer, 1991).

### 3.1.2 ESTADOS DE DISPERSIÓN DE LA LECHE

La leche es un sistema polidisperso ya que los diferentes componentes se encuentran en diferentes grados de dispersión con diferentes tamaños de partículas disueltos en agua.

En este sistema biológico complejo, la grasa se encuentra, en la leche recién ordeñada, emulsionada en forma de gotitas rodeadas de una membrana (alrededor de  $5-10 \times 10^9$  gotitas/mL de leche, con un diámetro de entre 0.1 y 10  $\mu\text{m}$ ). Las proteínas se encuentran bien dispersas en la leche y formando un coloide en forma de micelas (alrededor de  $10^{14}$  micelas/mL de leche) con diámetros entre 0.02 y 0.6  $\mu\text{m}$ , en forma de proteínas disueltas en la disolución acuosa homogénea del resto de componentes de la leche. La lactosa es el carbohidrato principal de la leche y se encuentra disuelto (fig. 3.1) (Shlinmme, 2002).

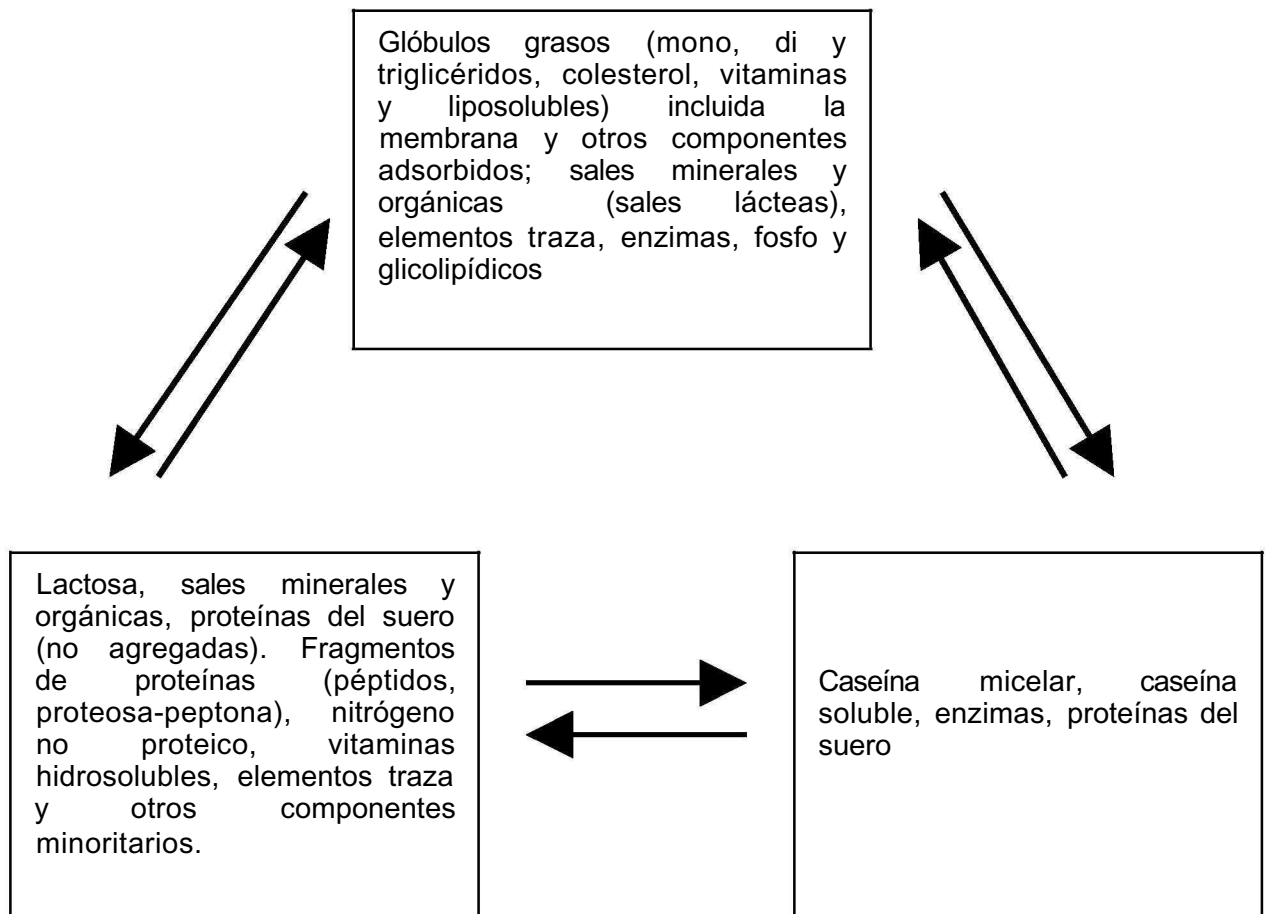


Figura 3.1 Representación esquemática del equilibrio entre las fases dispersas, coloidales y disueltas de la leche (Shlinmme, 2002).

### 3.1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE

La composición física y química de la leche puede variar, dependiendo de factores como la edad, la raza de la vaca, el nivel de actividad, el estado de lactación y el uso de medicación. Como medida, los sólidos lácteos totales, que son carbohidratos, grasa y proteína, representan 12-13% de la leche, y los sólidos lácteos no grasos que incluyen la lactosa, caseínas, proteínas del suero y minerales, representan aproximadamente 8.5% de la leche (Vaclavik, 2003).

La leche es una mezcla acuosa heterogénea compuesta principalmente por agua, minerales, proteínas, vitaminas, carbohidratos y lípidos. La tabla 3.1 presenta la composición de la leche.

Tabla 3.1 Composición cuantitativa de la leche de vaca

<b>CONSTITUYENTE PRINCIPAL</b>	<b>LIMITES DE VARIACIÓN (%)</b>	<b>VALOR MEDIO (%)</b>
<b>Agua</b>	85.5-89.5	<b>87.5</b>
<b>Sólidos totales</b>	10.5-14.5	<b>13.0</b>
<b>Grasa</b>	2.5-6.0	<b>3.9</b>
<b>Proteínas</b>	2.9-5.0	<b>3.4</b>
<b>Carbohidratos</b>	3.6-5.5	<b>4.8</b>
<b>Minerales</b>	0.6-0.9	<b>0.8</b>

FUENTE: Madrid, 1990

La leche está formada de aproximadamente 87.5% de agua y de 12.5% de sólidos o materia seca total. El agua es el componente principal de la leche y actúa como disolvente de los demás compuestos (Spreer, 1991).

La leche contiene como término medio un 3.3% de proteínas (tabla 3.2), de las que 80% son caseínas (proteína principal). También se encuentran las lactoalbúminas, lactoglobulinas, proteasas-peptonas y enzimas. Las caseínas son fosfoglucoproteínas que precipitan de leche descremada a pH 4.6 y 20°C. Las caseínas forman grupos complejos moleculares llamados micelas de caseínas, éstos pueden medir hasta 0.4  $\mu\text{m}$ .

Tabla 3.2 Diferentes cantidades de proteínas presentes en la leche de vaca

<b>TIPO DE PROTEÍNA</b>	<b>% APX. EN LECHE DESNATADA</b>	<b>% APX. DEL TOTAL DE PROTEÍNAS EN LECHE DESNATADA</b>	<b>% APX. EN PROTEÍNAS DE LECHE ENTERA</b>
Caseínas	2.6		80
$\alpha$ -caseínas		50	
k-caseínas		12	
$\beta$ -caseínas		30	
Proteínas del suero	0.6		19
Seroalbúminas bovinas		1	
$\beta$ -lactoglobulinas		10	
$\alpha$ -lactoglobulinas		4	
Inmunoglobulinas		3	
Proteínas de la membrana del glóbulo graso			5

FUENTE: Badui, 2002



Las enzimas se encuentran distribuidas en la leche, ya sea unidas a las micelas de caseína, a la membrana del glóbulo de grasa o en forma libre en el suero; se producen en la glándula mamaria y de ahí se transfieren a la leche; algunas no son necesariamente inherentes a ella, sino que provienen de una contaminación microbiana (Badui, 2002).

Entre las enzimas naturales más importantes destacan las indicadas en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Enzimas más importantes de la leche de vaca

ENZIMA	NÚMERO DE CALIFICACIÓN	LOCALIZACIÓN EN LA LECHE	CARACTERÍSTICAS
Lipasa	EC 3.1.1.3	90% en las micelas y 10% en el suero	Responsable de reacciones de rancidez, sobrevive a la pasteurización y puede reactivarse en productos esterilizados; pH óptimo 8.6
Proteasa	EC 3.4.4	Asociada con las micelas	Resistencia al calor, actividad de endopeptidasa, se encuentra en muy bajas concentraciones; pH óptimo 8.8
Fosfatasa alcalina	EC 3.1.3.1	80% en la membrana del glóbulo graso y el resto en la fase acuosa	Usada como índice de pasteurización adecuada, puede haber reactivación en productos tratados a altas temperaturas
Catalasa	EC 1.11.1.6	Asociada con la membrana del glóbulo graso, con las micelas y con el suero	Aumenta por los leucocitos y se usa como prueba de mastitis; pH óptimo 7.0
Lactoperoxidasa	EC 1.11.1.7	Suero	La más resistente al calor, usada para detectar tratamientos térmicos muy fuertes en productos lácteos; pH óptimo 6.8
Xantina oxidasa	EC 1.2.3.2	Asociada con la membrana del glóbulo de grasa	Se desconoce su función en la leche

FUENTE: Badui, 2002

Las vitaminas se encuentran en la leche en pequeña cantidad pero tienen una gran importancia nutritiva. Algunas contribuyen al color de la leche y los productos lácteos. Dentro de las vitaminas hidrosolubles la B2 (riboflavina) es la más importante, aportando el 41% de nuestras necesidades diarias; mientras que la vitamina B12 en la leche cubre más del 20% de nuestras necesidades en esta vitamina; también contiene vitamina B1, B6, C (ácido ascórbico). Y como vitaminas liposolubles contiene A, D, E.

Los carbohidratos están compuestos esencialmente por lactosa (compuesto cuantitativamente más importante de los sólidos no grasos) y algunos otros azúcares en pequeñas cantidades, como la glucosa (80.1%) y la galactosa.

De todos los componentes los lípidos varían más, estando en una proporción que oscila entre el 3.2% y el 6%. Entre los componentes predominan los triglicéridos, que constituyen el 98% de la grasa láctea; de los ácidos grasos el butírico. Hay cantidades mesurables de fosfolípidos, colesterol y cerebrósidos (Varnam, 1995).

La materia grasa de la leche se encuentra en forma de glóbulos grasos de forma esférica. El diámetro de los glóbulos grasos varía desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 12  $\mu\text{m}$ , con un diámetro medio de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . El diámetro medio está relacionado con el contenido graso de la leche y es mayor en la leche rica en grasa (Varnam, 1995).

La homogenización se utiliza para reducir el diámetro medio de los glóbulos de grasa por debajo de 0.8  $\mu\text{m}$  de forma que el movimiento de las fuerzas brownianas de dispersión supera la tendencia de la flotación. La membrana de los glóbulos grasos es insuficiente para mantenerlos estables tras la homogenización, porque presentan una mayor superficie de la grasa y actúan como agentes emulsionantes estabilizando los glóbulos grasos (Varnam, 1995).

La incineración de la leche deja las cenizas, un residuo que equivale a un 0.70 a 0.80% del peso de la leche. Las cenizas incluyen todos los elementos minerales de la leche, pero no todos sus componentes salinos. El contenido salino es de un 0.90% de su peso. Durante la incineración, parte de las sales orgánicas se desintegran, particularmente los citratos. Las sales importantes son: bicarbonatos, cloruros, citratos de calcio, magnesio, sodio (Warner, 1979).

### **3.1.4 COMPOSICIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA LECHE**

La leche tiene un sabor ligeramente dulce y un aroma delicado. El sabor dulce proviene de la lactosa, mientras que el aroma viene principalmente de la grasa. Sin embargo, la leche absorbe fácilmente olores del ambiente. Además, ciertas

clases de forrajes consumidos por las vacas proporcionan cambios en sabor y olor a la leche. También, la acción de microorganismos puede tener efectos desagradables en sabor y olor.

La leche tiene un color ligeramente blanco amarillento debido a la grasa y a la caseína. Los glóbulos de grasa y en menor grado la caseína, impiden que la luz pase a través de ella, por lo cual la leche parece blanca. El color amarillo de la leche se debe a la grasa, en la que se encuentra el caroteno. Este es un colorante natural que la vaca absorbe con la alimentación de forrajes verdes. La leche descremada toma un color azulado, causado por la vitamina B2.

La presencia de ácidos tiene gran importancia en la elaboración de la leche. La acción de estos ácidos afecta los fenómenos microbiológicos, la formación de la mantequilla y la precipitación de las proteínas.

La acidez se expresa en la cantidad de ácido que puede neutralizarse con hidróxido de sodio al 0.1 N. Así se mide el ácido presente en la solución. La acidez promedio de la leche cruda fresca expresada en términos de ácido láctico es de 0.165%, pero la leche fresca no contiene ácido láctico y la acidez es debida a: fosfatos, proteína y citratos y cuando la acidez sobrepasa de 0.18%, ésta se debe al ácido resultante de la acción bacteriana (Revilla, 1983).

El pH puede variar de 6.4 a 6.8 (tiende a la neutralidad) es una solución ligeramente ácida. Las variaciones del pH dependen del estado sanitario de la glándula mamaria; de la cantidad de CO<sub>2</sub> disuelto en la leche y del desarrollo de los microorganismos que, al desdoblar la lactosa, promueven la producción de ácido láctico (Keating, 1999).

La densidad promedio es de 1.030 g/mL. Cuando la leche está alterada por la adición de agua, la densidad será menor a 1.028 g/mL y cuando es desnatada, la densidad es mayor a 1.036 g/mL.

Cuando se elimina el agua de la leche la leche contiene de 125 g hasta 130 g de este extracto de sólidos por litro. La cantidad depende mucho del contenido graso de la leche.

El punto de congelación es una de las constantes físicas más estables de la leche. El descenso del punto de congelación está directamente relacionado con la concentración de solutos en una solución, es decir, es una medida del número de moléculas o de iones que se encuentran en solución en la fase acuosa de la leche. Este puede oscilar entre - 0.52 y - 0.56°C las variaciones superiores a -0.52°C indican adición de agua o aguado (Riel, 1991). Por otra parte la leche hierve a 100.5°C al nivel del mar a causa de las sales y la lactosa disuelta.

En relación con la viscosidad y a pesar de contener de 12 a 14% de sólidos, la leche se comporta prácticamente como un fluido newtoniano semejante al agua, con una viscosidad de 2 cp (Alais, 1998).

El calor específico es el número de calorías que se necesitan para elevar la temperatura de un gramo de la sustancia en un grado Celsius. El calor específico de la leche es de 3.88 j/g °C (0.93 BTU/lb°F) y al igual que en todos los productos lácteos, varía en forma directa de acuerdo con el contenido de agua y grasa (Riel, 1991).

## 3.2 MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE

### 3.2.1 IMPORTANCIA DE LOS MICROORGANISMOS EN LOS LÁCTEOS

La importancia de los microorganismos en los productos lácteos se debe a tres razones (ICMSF, 2001):

1. Los microorganismos son los agentes responsables de los sabores, aromas y características físicas de algunos productos lácteos.
2. Los microorganismos pueden ocasionar alteraciones debido a su crecimiento o a la producción de enzimas.
3. Los productos lácteos contaminados con microorganismos patógenos o sus toxinas pueden constituir riesgo para la salud.

Las tasas y tipos de microorganismos presentes en la leche recién ordeñada, es decir, la microflora inicial, refleja directamente la contaminación microbiana durante su obtención. La microflora de la leche depende de la microflora inicial, de la temperatura a la que la leche se ha enfriado, de la temperatura a la que se ha almacenado y del tiempo transcurrido hasta la recogida (Robinson, 1987).

Los diferentes microorganismos alcanzan la leche por dos vías principales: la vía mamaria y el medio externo.

1. **Mamaria:** los microorganismos que pueden alcanzar la ubre, igualmente pueden llegar a contaminar la leche antes o después del ordeño. Estos microorganismos pueden alcanzar la leche por vía mamaria ascendente o mamaria descendente. Por vía ascendente lo hacen bacterias que se adhieren a la piel de la ubre y posterior al ordeño entran a través del esfínter del pezón (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, coliformes). La vía descendente o hematogena la utilizan los microorganismos que pueden causar enfermedad sistémica o tienen la propiedad de movilizarse por la sangre y a través de los

capilares mamarios llegar a infectar la ubre (*Salmonellas*, *Brucellas*, *Mycobacterium tuberculosis*).

2. **Medio externo:** la contaminación de la leche puede ocurrir una vez que esta ha sido extraída de la glándula mamaria. Los utensilios, tanques de almacenamientos, transportes e incluso el personal que manipula la leche, son fuentes de contaminación de microorganismos que utilizan esta vía, que en algunos casos son las más abundantes, causantes de grandes pérdidas en la calidad del producto.

### 3.2.2 PRINCIPALES GRUPOS DE MICROORGANISMOS QUE SE ENCUENTRAN EN LA LECHE

Los microorganismos de la leche son de cuatro tipos: bacterias no patógenas; bacterias formadoras de ácido láctico, causantes de la fermentación; bacterias de putrefacción, y bacterias patógenas, siendo estas últimas las únicas peligrosas para la salud, porque provocan serias enfermedades e infecciones. Las bacterias patógenas más comunes en la leche son: bacilos tíficos y paratíficos, bacilo diftérico, germen de la escarlatina y *Brucella Melitensis* (que provoca la fiebre de Malta o brucelosis) (Cañameras, 2003).

Dada las características de la leche cruda, los microorganismos predominantes y que se ven favorecidos para su crecimiento son las bacterias. En la leche se pueden encontrar diversos géneros y especies bacterianas.

#### 3.2.2.1 Bacterias Gram positivas

##### 3.2.2.1.1 Bacterias lácticas

Son un grupo de bacterias de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran en el suelo y en cualquier lugar donde existan altas concentraciones de carbohidratos, proteínas desdobladas, vitaminas y poco oxígeno. Son Gram (+) y su forma puede ser bacilar, cocoide u ovoide. Algunas tienen forma bifida (*Bifidobacterium*). Soportan pH 4 en leche. Son anaeróbicas facultativas, mesófilas y termófilas y de crecimiento exigente. Pueden ser homofermentativas (más del 90% de su metabolismo resulta en ácido láctico) o heterofermentativas (producen además del ácido láctico, otros ácidos y gases). Los principales géneros de bacterias ácido lácticas son: *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragonococcus*, *Alloiococcus* y *Bifidobacterium*.

Su estudio en el ámbito tecnológico es importante por lo siguiente:

- Son formadoras de textura y ayudan al establecimiento de las condiciones para la elaboración de ciertos productos lácteos. Por efecto de la acidez producida por la fermentación de la lactosa, la leche puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH isoeléctrico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos. En la elaboración de crema y mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumentar el rendimiento. Algunas especies producen polisacáridos (gomas), que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura (*S. termophilus*, *Lb. bulgacricus*, *Lb. cremoris*).
- Aportan sabor y aroma, ya que como parte de su metabolismo fermentativo se da la producción de acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. El diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla. La acetoina lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados. Además la producción de enzimas que intervienen en el afinado de los quesos por degradación de las proteínas y las grasas afectan notablemente las características organolépticas de los mismos.
- Ejercen efecto preservador manifestado en la prolongación de la vida útil de los productos elaborados con sus cultivos. Este efecto se lleva a cabo por varios mecanismos: a) ciertas especies producen bacteriocinas (*Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Enterococcus*) las cuales son proteínas que se comportan como antibióticos y que inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con estas; b) con la producción de ácido y descenso del pH se logra la inhibición de otras especies bacterianas y la conservación de los alimentos; c) el efecto preservador también se cumple gracias a la competencia por nutrientes que se da entre las diversas especies bacterianas.
- Aportan beneficios para la salud de los consumidores, el cual se ha descrito como efecto probiótico. Este puede manifestarse de manera específica en la prevención y reducción de los síntomas en los cuadros diarreicos. Además se le han atribuido a las bacterias lácticas, efecto preventivo de tumores, anticolesterolémico y modulador del sistema inmunológico.

### 3.2.2.1.2 Micrococcos

Débilmente fermentadores, forman parte de la flora inocua que contamina la leche cruda. Tienen poca actividad enzimática, por lo tanto son de muy poca importancia como agentes de adulteración en la leche. Sin embargo por ser la flora más abundante en leche cruda y tener cierta capacidad proteolítica pueden llegar a ser causante de alteraciones en leches pasteunzadas mal almacenadas.

### 3.2.2.1.3 Estafilococos

Son anaerobios facultativos, fuertemente fermentadores. Son de gran importancia desde el punto de vista sanitario. Causan mastitis y pueden provocar enfermedades o intoxicaciones en los humanos. *Staphilococcus aureus* produce una exotoxina que causa fuertes trastornos intestinales en los humanos, la cual es termorresistente, por lo cual no es destruida con la pasteurización. El *Staphilococcus epidermidis* se ve implicado en algunos casos de mastitis, por lo cual puede llegar a contaminar la leche.

### 3.2.2.1.4 Bacterias esporuladas

Los *Bacillus* son bacterias aeróbias con actividad enzimática variada; producen acidificación, coagulación y proteolisis. Los *Clostridium* son anaerobios estrictos, producen gas. Algunos producen toxinas patógenas (*Clostridium botulinum*).

Ambos géneros son de poca importancia en leche cruda, su crecimiento es inhibido por las bacterias lácticas. Cobran importancia en productos lácteos como en leches pasteurizadas, quesos fundidos, leches concentradas, quesos de pasta cocida. Resisten la pasteurización por su capacidad de producir esporas, las cuales solo se destruyen a temperaturas por encima de 100 °C.

Otras bacterias Gram (+) que pueden encontrarse en la leche son *Corynebacterium*, bacterias propiónicas, *Brevibacterium* estos últimos se encuentran en las cortezas de algunos quesos madurados almacenados en condiciones húmedas.

## 3.2.2.2 Bacterias Gram negativas

### 3.2.2.2.1 Enterobacterias

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* son huéspedes normales del intestino de los mamíferos, por lo tanto su presencia en el agua y la leche se relaciona con contaminación de origen fecal. Las enterobacterias son menos

abundantes en la leche que otras bacterias Gram (-), sin embargo, tienen una gran importancia desde dos puntos de vista, higiénico: ya que varias de estas especies tienen poder patógeno, de las cuales la más temible es la *Salmonella* y otras que pueden provocar trastornos gastrointestinales (*Yersinia*, *E. coli*, *Shigella*); y tecnológico: ya que son bacterias heterofermentativas, grandes productoras de gas (carbónico e hidrógeno) además producen sustancias viscosas y de sabor desagradable, todo lo cual conduce a la alteración de la leche o subproductos.

De las enterobacterias las más comunes encontradas en los productos lácteos son las del grupo Coliformes (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*). La determinación de su presencia indica calidad higiénica de la leche cruda y pasteurizada. Enterobacterias más comunes de la leche cruda: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerógenes*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Serratia*. Los últimos dos géneros se encuentran con poca frecuencia, son microorganismos no patógenos pero por su poder proteolítico pueden provocar alteraciones en la leche.

#### **3.2.2.2.2 Pseudomonas**

Más del 50% de la flora Gram (-) de la leche cruda está representada por este género. Juegan un papel importante en la conservación de productos lácteos, ya que además de ser psicrófilas, varias especies tienen un gran poder proteolítico y lipolítico. Además se ha descrito que algunas de estas enzimas resisten temperaturas por encima de los 80°C, por lo cual pueden causar alteraciones aún en productos elaborados con leches pasteurizadas.

#### **3.2.2.2.3 Acromobacteriaceae**

Este grupo de bacterias no fermentan la lactosa, no son proteolíticas ni patógenas, pero representan las bacterias psicrófilas que crecen en las leches conservadas a baja temperatura, algunas pueden producir sustancias viscosas y pigmentos. Se han descritos los géneros *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter*.

#### **3.2.2.2.4 Bacterias Gram negativas diversas**

Las Brucellas son bacterias patógenas para los animales y para el hombre, aunque poco frecuente, pueden llegar a causar cuadros de mastitis. Se destruyen con la pasteurización.



### 3.2.2.3 Mohos y Levaduras

No tienen importancia en leche fluida, si no más bien en los productos. Algunas especies son utilizadas como cultivos lácteos para el afinado de los quesos madurados como el *Penicillium candidum* y *Penicillium camemberti* en los quesos de corteza blanca como el Camembert y el *Penicillium roqueforti* en los quesos de pasta azul (Roquefort).

Las levaduras al igual que los mohos son de poca importancia en la leche líquida y son fácilmente destruidos a temperaturas de pasteurización. En la leche se encuentran la especies *Cándida cremoris*, *Sacharomices lactis*, *Sacharomices kefir* y *Torula kefir* principalmente en los granos de kefir utilizados para producir esta bebida láctea, caracterizada por su sabor ácido-alcohólico, producto de la fermentación de la lactosa por estas especies.

### 3.2.2.4 Virus

La leche se puede contaminar con los virus causantes de la fiebre aftosa, estomatitis vesicular. Los más importantes para la industria láctea son los bacteriófagos virus que infectan a las bacterias produciendo su muerte, por lo cual pueden afectar la producción de derivados lácteos causando lisis de los cultivos añadidos para la producción de sabor y aroma.

## 3.2.3 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LÁCTEOS

El riesgo de contraer enfermedades relacionadas con microorganismos es mucho más alta en los países en desarrollo que en los países desarrollados, según Sanders, (1999). Sin embargo, debido a la ausencia de investigación es difícil registrar la procedencia de estas enfermedades relacionadas con alimentos y hace que también sea difícil estimar el costo que estas enfermedades provocan, aunque es indiscutible el alto costo que éstas causan. Los costos más obvios son para la salud del consumidor, pues éstas enfermedades afectan directamente, causando enfermedades diarreicas e intestinales e indirectamente causan la desconfianza del consumidor de los productos alimenticios.

Los costos económicos para la sociedad incluyen el cuidado de enfermos, ausentismo laboral y escolar, pérdida de productividad en los centros de trabajo, pérdida de ingresos en el cierre o paro de actividades en negocios, costos de investigación, seguro médico y costos médicos más altos por enfermedades crónicas.

Las enfermedades transmitidas por alimentos se llaman ETA's y pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas.

Un brote de ETA se da cuando dos o más personas sufren una enfermedad similar después de ingerir un mismo alimento y los análisis epidemiológicos señalan al alimento como el origen de la enfermedad, que luego es confirmado por el laboratorio (Bravo, 2002).

Las ETA's pueden manifestarse a través de:

-Infecciones transmitidas por alimentos: son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos que contienen microorganismos perjudiciales vivos. Por ejemplo: salmonelosis, hepatitis viral tipo A.

-Intoxicaciones causadas por alimentos: ocurren cuando las toxinas o venenos de bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido. Estas toxinas generalmente no poseen olor o sabor y son capaces de causar enfermedades después que el microorganismo es eliminado. Algunas toxinas pueden estar presentes de manera natural en el alimento, como en el caso de ciertos hongos y animales como el pez globo. Ejemplos: botulismo, intoxicación estafilocócica o por toxinas producidas por hongos.

-Toxiinfección causada por alimentos: es una enfermedad que resulta de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Ejemplo: cólera (OPS, 2002).

### **3.2.3.1 ENFERMEDADES CAUSADAS POR CONSUMIR LECHE CONTAMINADA**

En México, indirectamente se han encontrado productos lácteos contaminados como en quesos y cremas, éstos han sido elaborados a partir de leche bronca no pasteurizada que pueden ser causante de enfermedades como listeriosis, brucelosis, salmonelosis y tuberculosis, así lo informó la Secretaría de Salud (PROFECO, 2005).

El Sistema de Información Regional para la Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos de la Organización Panamericana de Salud reportó que en México en el año 1993 al 2002, los brotes de enfermedades

por consumir leche o productos lácteos contaminados abarcan enfermedades como botulismo y hepatitis y estas enfermedades concentraron en lugares como viviendas, restaurantes, puestos callejeros, comedores, escuelas, unidades de salud y otros (tabla 3.4)

Tabla 3.4 Brotes de Enfermedades transmitidas por lácteos en México durante el periodo 1993-2002

ENFERMEDAD	MICROORGANISM O CAUSANTE	BROTOS	AFFECTADOS	ENFERMOS	MUERTOS
Botulismo	<i>Clostridium Botulinium</i>	1	12	10	2
Brucelosis	<i>Brucilla sp.</i>	4	77	77	0
Colibacilosis	<i>Escherichia coli</i>	4	115	115	0
Hepatitis	Hepatitis A	1	3	3	0
Intoxicación Estafilocócica	<i>Staphylococcus sp. y Staphylococcus aureus</i>	3	112	112	0
Por <i>Bacillus Cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	1	4	4	0
Por Coliformes	Coliformes	1	4	4	0
Salmonelosis	<i>Salmonella sp.</i>	3	139	138	1

FUENTE: OPS, 2006

Es prácticamente imposible llevar adelante un negocio de los alimentos sin estar exento de que las bacterias causantes de enfermedades se hagan presentes. Por lo tanto, realmente es importante que no le demos la posibilidad de que se reproduzcan, ya que su multiplicación en cierto nivel puede ocasionar un brote de enfermedad.

### 3.2.4 MICROORGANISMOS PATÓGENOS DE LA LECHE

Los microorganismos a estudiarse dentro del presente trabajo de tesis son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* sus características y enfermedades donde están involucrados se enlistan a continuación:

### 3.2.4.1 Características de la especie *Escherichia coli*

Este organismo, originalmente denominado *Bacterium coli*, fue aislado en las heces de niños hace más de dos siglos. En 1920, al organismo le fue asignada la denominación nueva de *Escherichia* y cada vez existían más testimonios de que la bacteria podía causar ocasionalmente gastroenteritis con una importante mortalidad en los niños. A mediados de la década de los años 40, el papel de *Escherichia coli* como enteropatógeno fue demostrado de modo válido y se adoptaron medidas de control para reducir la incidencia de esta enfermedad.

*E. coli* patógeno intestinal se define como aquellas cepas de *E. coli* que son capaces de causar una enfermedad diarreica en el hombre y en los animales.

Las bacterias de la especie *E. coli* son representantes de la familia Enterobacteriaceae. Como tales, los organismos son bacilos cortos Gram negativos, catalasa positiva, oxidasa negativos y anaerobios facultativos. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de ese azúcar (ICSMF, 2001).

Las cepas de *Escherichia coli* son una parte común de la microflora anaeróbica facultativa normal del tracto intestinal de las personas y animales de sangre caliente, por tanto son excretadas en las heces. Los alimentos pueden ser contaminados por manipuladores de alimentos infectados que practican una defectuosa higiene personal o por contacto con aguas residuales. Por lo tanto, la prevención se apoya en no consumir alimentos crudos de origen animal, observar una higiene meticulosa y almacenar o conservar los alimentos listos para consumo (Mossel, 2003).

#### 3.2.4.1.1 Enfermedades por *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* que provocan la enfermedad diarreica se clasifican en grupos específicos basados en propiedades de virulencia, mecanismos de patogenicidad, síndromes clínicos y serogrupos O:H diferentes: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasor (EIEC) y *E. coli* enterohemorrágico (*E. coli* O157:H7; EHEC). (ICMSF, 2001 y Doyle, 2001). La tabla 3.5 resume los signos y síntomas.

Tabla 3.5 Signos y síntomas de las enfermedades relacionadas con *E. coli*

TIPO DE <i>E. coli</i> PATÓGENO	TIEMPO PARA EL COMIENZO	DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD	SÍNTOMAS
Enteropatógeno (EPEC)	17-22 h (promedio 36 horas)	6 h – 3 días (prom. 24 h)	Diarrea, náuseas, dolor abdominal, vómito, cefaladía, fiebre, escalofríos; diarrea acuosa con abundante cantidad de moco pero no sangre.
Enterotoxigénico (ETEC)	8-44 horas (promedio 26 horas)	3-19 días	Diarrea acuosa, fiebre ligera, retortijones abdominales, malestar, náuseas; en la forma más grave se parece al cólera, con diarrea intensa parecida al agua de arroz que acaba en deshidratación.
Enteroinvasor (EIEC)	8-24 horas (promedio 11 horas)	Días a semanas	Diarrea profusa o disentería, escalofríos, fiebre, cefalagia, mialgia, retortijones abdominales, con frecuencia las deposiciones contienen moco y vetas de sangre.
Enterohemorrágico (EHEC)	3-9 días (promedio 4 días)	2 – 9 días	Colitis hemorrágica, diarrea muy sanguinolenta, dolor abdominal intenso, vómito, sin fiebre. Síndrome urémico hemolítico (HUS): diarrea sanguinolenta, neuropatía aguda, convulsiones, coma muerte. Púrpura trombótica trombocitopenica: similar al HUS fiebre y trastorno del sistema nervioso central.

FUENTE: ICMSF, 2001

### 3.2.4.2 Características de la especie *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus aureus* es una bacteria esférica de 0.8-1  $\mu\text{m}$  de diámetro, Gram (+) que se presenta en los cultivos en parejas, cadenas cortas o agrupadas como racimos de uvas. Los estafilococos son anaerobios facultativos producen catalasa, fermentan lentamente muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas. Los estafilococos son bacterias no esporuladas y sin movilidad pero resistentes a la desecación, es decir, fácilmente dispersables por las partículas de polvo a través del aire y las superficies (Forsythe, 2003).

El hábitat más habitual de *Staphylococcus aureus* es el tracto respiratorio superior, especialmente la nariz, garganta y la superficie de la piel. También se encuentran en aguas residuales, leche y otros alimentos, equipos de las industrias de alimentos, personas y animales.

Los estafilococos pueden producir enfermedades porque tienen la capacidad de crecer y propagarse en los tejidos y mediante la producción de muchas sustancias extracelulares, estas sustancias son enzimas y toxinas (Brooks, 1999).

Los alimentos implicados en la intoxicación de este microorganismo son la carne y los derivados cárnicos, ovoproductos y ensaladas a base de huevos, atún, pollo, papas, macarrones, productos de pastelería, leche y productos lácteos. Los alimentos que requieren de mucha manipulación en su preparación y que después se mantienen a altas temperaturas son los implicados en esta intoxicación.

*S. aureus* compite mal con otras bacterias y raramente causa infección en productos crudos, aunque una excepción es en la leche fresca en la que los niveles de esta bacteria son muy altos (ICMSF, 1998).

#### 3.2.4.2.1 Intoxicación Estafilocócica Estafiloenterotoxiosis

*Staphylococcus aureus* se asocia con enfermedades transmitidas por alimentos ya que mientras crece produce diferentes enterotoxinas proteicas termoestables (Madigan, 2003).

Las enterotoxinas estafilocócicas son producidas por cepas muy específicas; sin embargo, una de ellas es capaz de sintetizar más de un serotipo de enterotoxinas. Actualmente se diferencian por su actividad serológica no menos de 7 enterotoxinas que se designan A, B, C1, C2, C3, D y E. La enterotoxina del serotipo A es la que con más frecuencia aparece en los brotes de intoxicación alimentaria y le siguen en orden decreciente las de los serotipos C1, B, D y E.

Todas las enterotoxinas son resistentes al calor y pueden resistir el tratamiento térmico que se utiliza para esterilizar los alimentos.

No todas las cepas de *S. aureus* son capaces de producir la intoxicación estafilocócica, solamente las cepas que producen una enterotoxina y que se conocen como *S. aureus* enterotoxigénico. La intoxicación se produce por el consumo de alimentos en los que se ha multiplicado *S. aureus* enterotoxigénico y ha producido toxinas en el propio alimento. Es necesario que *S. aureus* enterotoxigénico se encuentre en niveles de al menos  $10^6$  ufc/g para que se produzca suficiente cantidad de toxina para provocar síntomas en el consumidor.

Estas cifras de  $10^6$  ufc/g se alcanzan con facilidad si los alimentos una vez elaborados no se mantienen a temperaturas adecuadas (o refrigeración o por encima de  $60^{\circ}\text{C}$ ) o bien si se almacenan durante demasiado tiempo.

Las intoxicaciones alimentarias producidas por las enterotoxinas estafilocócicas constituyen un problema mundial y guardan estrecha relación con los hábitos alimentarios regionales. La ingestión de una dosis de menos de 1.0 microgramo de enterotoxina en un alimento contaminado produce los síntomas de la enfermedad.

La aparición de los síntomas de la intoxicación alimentaria tiene lugar entre 1 y 7 horas después de la ingestión del alimento que contiene enterotoxinas del estafilococo. Los síntomas más comunes son náuseas, vómitos, espasmos abdominales y diarrea. En casos graves también pueden aparecer dolor de cabeza, dolores musculares y cambios en la presión arterial. La cura es rápida, generalmente en un plazo de 48 horas, sin embargo en casos graves la duración es mayor.

### 3.3 MÉTODOS TÉRMICOS DE DESINFECCIÓN

Uno de los métodos más comunes de conservación de los alimentos es mediante un calentamiento que destruya los microorganismos y las enzimas que los dañan. La pasteurización destruye bacterias patógenas, levaduras y mohos, y 95-99% de las bacterias no patógenas.

En el manejo de la leche fresca dedicada a obtener estos productos, se siguen diferentes pasos que son comunes, tales como: a) centrifugación, para eliminar las partículas extrañas, como células de las glándulas mamarias, leucocitos, tierra y otros posibles contaminantes; b) estandarización de la grasa, para que, en caso de que el producto final contenga más de la que requiere, se elimine por

centrifugación y se use en la elaboración de la mantequilla, y c) homogenización para reducir el tamaño de los glóbulos de grasa grandes y hacer un número mayor de ellos, más pequeños. El tratamiento térmico (pasteurización) puede emplear varias condiciones de temperatura y tiempo:

- 63°C (145°F) durante 30 o más minutos es considerado pasteurización a baja temperatura o pasteurización baja.
- 72°C (161°F) durante 15 segundos es el método de pasteurización a elevada temperatura o pasteurización alta.
- 138°C (280°F) durante 2 segundos: ultrapasteurización (UHT).

Inicialmente la pasteurización se originó para destruir al *Microbacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis y consistía de calentar la leche a 61.8°C durante 30 minutos, sin embargo todavía sobrevivía la *Coxiela Bumettii*. Es por esto que se incrementó la temperatura a 63°C. Con esto se llega a la reducción de 12 ciclos logarítmicos. Paralelamente también se eliminan otros microorganismos más termosensibles como los coliformes y se inactiva la fosfatasa alcalina, pero no a las esporas y otras enzimas, ni las bacterias más termorresistentes como las lácticas (fig. 3.2); es decir, que la leche pasteurizada necesita de refrigeración ya que contiene una determinada cuenta microbiana de bacterias lácticas que no son patógenas, pero sí fermentativas y que provocan que la vida de anaquel de este producto sea de solo unos días (Badui, 2002).

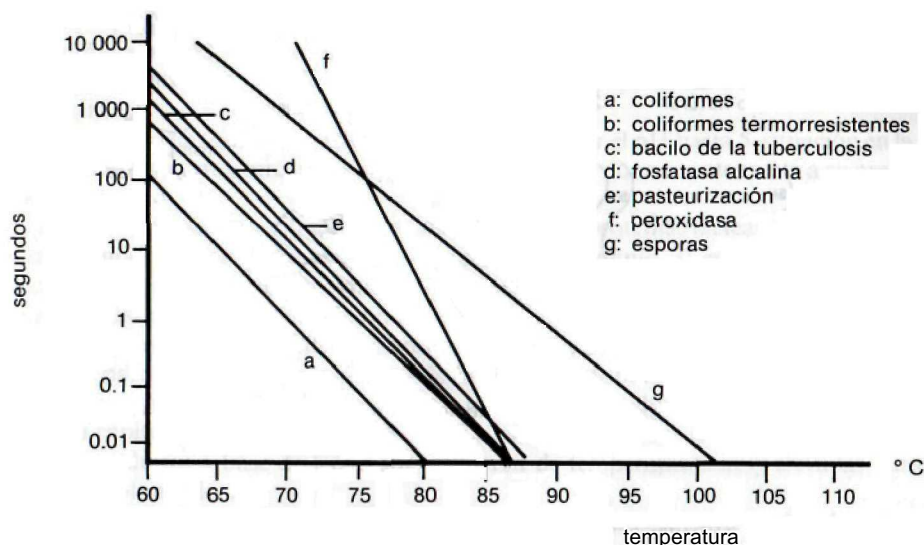


Figura 3.2. Diagrama de la pasteurización de la leche y su relación con la destrucción de microorganismos y de enzimas.

Es por esto que el procesado UHT es un tratamiento más drástico que pretende destruir todos los microorganismos patógenos y no patógenos y enzimas, con



esto se obtiene un producto que se puede almacenar sin refrigeración por varios meses sin abrir el envase.

### **3.3.1 MÉTODOS DE PASTEURIZACIÓN**

Existen dos métodos básicos de pasteurización, batch o continuo.

#### **3.3.1.1 Método Batch**

Es uno de los métodos más antiguos y más sencillos para eliminar patógenos, generalmente la leche cruda se introduce por bombeo a una tina o tanque de doble pared, calentada mediante vapor, y ahí permanece hasta que alcance la temperatura deseada; luego se le bombea a través de un enfriador de placas antes de envasarla. La leche se calienta hasta los 63°C y se mantiene a esta temperatura durante 30 minutos y luego se enfría rápidamente. Además de eliminar patógenos en la leche inactiva la enzima lipasa que de otra manera enranciaría la leche.

#### **3.3.1.2 Método Continuo**

En la pasteurización de la leche por este método se emplea a una temperatura de por lo menos 72°C por un mínimo de 15 segundos. El equipo más difundido para el calentamiento es el intercambiador de placas, que puede llegar a tratar cerca de 100 000 L/h. Se integra por una instalación constituida por distintas etapas dispuestas en serie. La leche parte del tanque de regulación a la sección de regeneración, en la que se precalienta con el producto ya pasteurizado; luego se prosigue al calentamiento con el objetivo de alcanzar la temperatura de pasteurización. Una vez alcanzada, su recorrido hasta la sección de generación le proporciona el tiempo de residencia necesario para completar su pasteurización. El enfriamiento se culmina en dos etapas consecutivas, una con agua fría y la otra con agua refrigerada. La instalación, que opera con agua caliente, incorpora una válvula de desviación de flujo que permite devolver el producto al tanque de regulación, antes de su enfriamiento, si éste no ha sido pasteurizado (fig. 3.3) (Rodríguez, 2000).

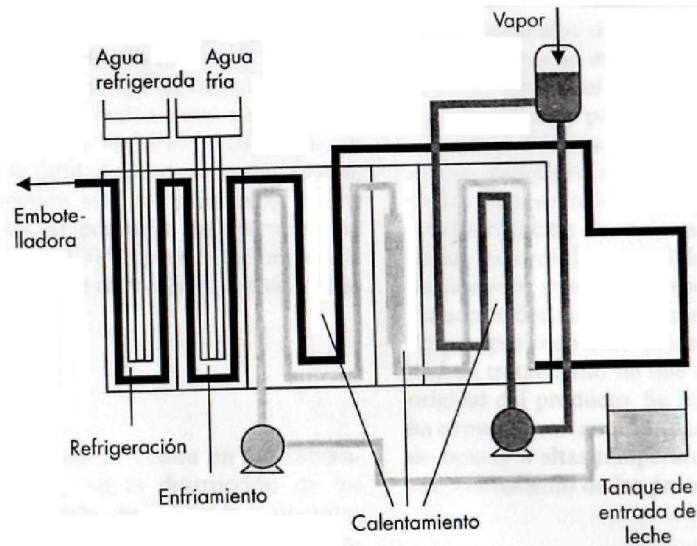


Figura 3.3. Instalación de pasteurización de intercambio de placas.

Las ventajas más significativas de estas instalaciones con respecto a las instalaciones batch son:

- Pasteurización más homogénea.
- Mecánicamente más simples.
- Tamaño menor.
- Menos mano de obra.
- Son más polivalentes en cuanto a diversidad de productos.
- Control más eficaz.

Para el caso de las instalaciones UHT pueden realizar el calentamiento por vía directa o indirecta.

Para el caso del calentamiento directo se logra con una mezcla directa de la leche y el vapor, inyectando el vapor en la leche o la leche en el vapor. Las temperaturas del calentamiento oscilan entre los 140°C y los 150°C, siendo el mantenimiento casi nulo. El agua que toma la leche se elimina posteriormente por expansión en la cámara de vacío, recobrándose de nuevo la composición inicial de la leche. Presenta la ventaja de la brevedad de los tiempos y la desventaja de necesitar un vapor de muy alta calidad.

Para el calentamiento indirecto, los procesos de calentamiento y de refrigeración se llevan a cabo en intercambiadores de placas, tubulares o en una combinación de estos intercambiadores. Son más convenientes los intercambiadores tubulares ya que permiten velocidades de flujo de aproximadamente de 2.5 m/s y tienen

como resultado un alto calentamiento. Mientras que los intercambiadores de placas solo alcanzan velocidades de hasta 0.35 m/s (Spreer, 1991).

### **3.3.2 EFECTO DE LA PASTEURIZACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES DE LA LECHE**

La situación ideal en el tratamiento térmico de la leche sería poderla calentar a una temperatura muy alta que asegurará una completa muerte microbiana, a un bajo costo de operación y que además no presentará cambios indeseables en la calidad nutritiva y sensorial del producto final. Como es lógico pensar a medida que aumenta la temperatura se favorece la aparición de cambios indeseables que a continuación se enlistan.

Para la pasteurización baja no se aprecian casi alteraciones en la leche, pero el efecto germicida, si el contenido inicial de microorganismos es elevado no se alcanzan los requisitos exigidos. El coste de los aparatos es muy elevado se utiliza principalmente en la elaboración de quesos.

En la pasteurización alta provoca alteraciones poco importantes por reacciones químicas de las proteínas séricas así como una precipitación ligera de las sales de la leche. Las vitaminas no se alteran significativamente, reduciéndose la vitamina C en un 20%. Se inactiva la fosfatasa alcalina.

En el sistema UHT se alcanza un efecto germicida muy alto hasta de un 100%, pero presenta otros inconvenientes se desnaturalizan el 30-60% de las proteínas séricas. También adquiere la leche un ligero sabor a cocida que se debe a la desnaturalización de las proteínas del suero, que dan lugar a sulfhídrico y cetonas a partir de los lípidos. Otras enzimas se ven inactivadas. Apenas si se observa un cambio de color alguno. El coste de la maquinaria, el consumo de energía y el grado de automatización de este procedimiento es considerablemente mayor que en la pasteurización baja y alta.

También se pueden analizar los componentes químicos de la leche para saber si los tratamientos térmicos dañan su estructura química. La grasa no se ve afectada por temperaturas inferiores a 100°C. A temperaturas superiores se puede producir la agrupación de algunos glóbulos de grasa.

La caseína no sufre ningún cambio detectable a temperaturas inferiores a 100°C, pero se producen cambios fácilmente detectables en las micelas de caseína cuando se calientan por encima de 65°C. El grado de coagulación con cuajo y la firmeza de la cuajada obtenida se ven fuertemente afectadas por un incremento en la temperatura y en el tiempo de mantenimiento de dicha temperatura. Ese

efecto es parcialmente causado por el agrupamiento de componentes de la caseína y en parte también por la destrucción térmica de algunos de los enlaces de calcio en la estructura micelar. Las proteínas séricas comienzan ya a desnaturalizarse a una temperatura de 65°C y se encuentran casi totalmente desnaturalizadas cuando la leche se calienta a 90°C durante 60 segundos. Después de calentar la leche a 72°C o más, y mantener dicha temperatura durante un minuto más o menos, la leche comenzará a oler y a sabores a cocido. Esto es debido a la liberación de compuestos que contienen azufre que provienen de la  $\beta$ -lactoglobulina y otras proteínas sulfuradas.

La enzima peroxidasa es inactivada si la leche se calienta a 80°C durante unos cuantos segundos, circunstancia que puede ser utilizada para demostrar si la pasteurización ha superado los 80°C. La catalasa es destruida por la pasteurización a 72°C durante 15 segundos. La fosfatasa es destruida por la pasteurización rápida de forma que la prueba de la fosfatasa es utilizada para determinar si se ha alcanzado la temperatura correcta.

La lactosa sufre cambios más visibles en la leche que cuando se encuentra en estado sólido. A temperaturas por encima de 100°C se produce una reacción entre la lactosa y las proteínas, produciéndose un pardeamiento enzimático de la leche

La vitamina C es la más sensible al calor, especialmente en presencia de aire. La pasteurización UHT es un intercambiador de placas puede, sin embargo, producirse sin prácticamente ninguna pérdida de vitamina C. Las otras vitaminas presentes en la leche apenas si sufren algún cambio con calentamientos moderados.

De las sales minerales presentes en la leche, sólo el hidroxifosfato cálcico, que se encuentra en las micelas de caseína, se ve afectado por el calentamiento. Cuando se calienta por encima de los 70°C pierde agua y forma ortofosfato cálcico insoluble (Madrid, 1990).

## **3.4 CONSUMO Y SUMINISTRO DE LECHE**

### **3.4.1 CONSUMO DE LECHE A NIVEL MUNDIAL**

Actualmente existen enormes disparidades en el consumo de productos lácteos a escala mundial que no pueden explicarse únicamente en función de las diferencias de renta per cápita existentes entre los distintos países.

Así, por ejemplo, el bajo consumo de productos lácteos en China es un fenómeno muy antiguo vinculado a su escasa tradición de pastoreo, lo que explica que sea cinco veces menor al de la India o al de los países del norte de África y los de Oriente medio (tabla 3.6).

La leche es uno de los alimentos más completos para la población humana y es natural que forme parte de las estrategias de seguridad alimenticia respecto a su producción y comercio internacional entre las naciones del mundo.

Tabla 3.6 Consumo anual de productos lácteos en el mundo en 1999

<b>GRANDES REGIONES DEL PLANETA</b>	<b>CONSUMO ANUAL DE PRODUCTOS LÁCTEOS PER CÁPITA (en kg)</b>
Europa occidental	231
Estados Unidos, Canadá y México (países del TLCAN., Tratado de libre comercio de América del Norte)	213
Países de Europa Central y oriente (PECO.) + ex-URSS.	159
América del Sur	126
África del Norte y Oriente medio	70
Asia meridional (principalmente la India)	62
África subsahariana	26
Asia oriental (principalmente China)	13

FUENTE: Larousse, 2004

### 3.4.2 CONSUMO DE LECHE EN MÉXICO

La industria de la leche en México se consolidó hasta los años cuarenta, debido al desarrollo industrial y a la expansión del mercado interno. Durante el periodo de 1950 a 1970 se efectuó un proceso de integración de la actividad lechera, dando como resultado el surgimiento de algunas de las pasterizadoras e industrializadoras de lácteos más importantes, las cuales actualmente se encuentran ubicadas en regiones favorecedoras del producto en México, tales como la Región Lagunera.

Según datos de la FAO de la ONU, durante el periodo comprendido entre 1992 y 2001, y como puede observarse en la fig. 3.4, la producción mundial de leche de bovino fue cercana a 5 mil millones de toneladas, destacando la participación de la Unión Europea con el 26%, seguida de los Estados Unidos (15%), Rusia (8%),

India (6%) y Brasil (4%), países que conjuntamente participaron con el 60% de la producción total.

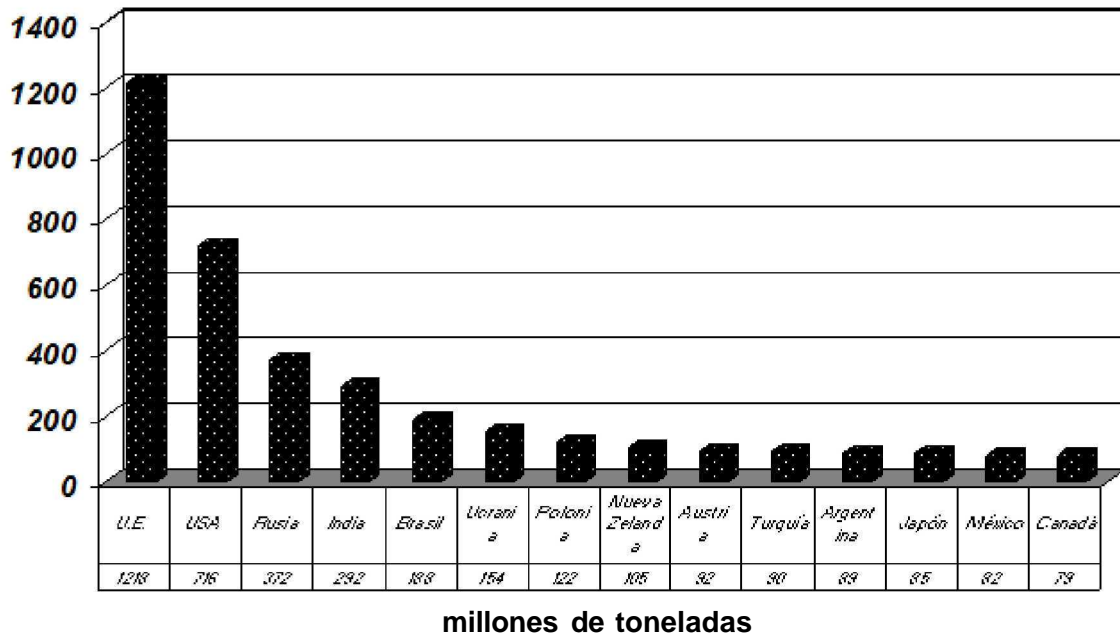


Figura 3.4 Producción mundial de leche durante el periodo comprendido entre 1992 y 2001 en millones de toneladas (SAGARPA, 2002).

Como país productor, México ocupa el treceavo lugar, con un promedio de 8 millones de toneladas anuales.

La producción de leche de bovino en México es muy heterogénea desde el punto de vista tecnológico, agroecológico y socioeconómico, incluyendo la gran variedad de climas regionales y características de tradiciones y costumbres de las poblaciones.

Según cifras del Servicio de Información Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), durante los últimos diez años (1992-2001) la producción total de leche de bovino fue de 80 millones de litros, y tuvo una tendencia de crecimiento constante, debido principalmente a que las expectativas para el sector lechero fueron más favorables gracias a los programas de apoyo concertados entre las instancias gubernamentales, los productores organizados y los industriales de la leche (fig. 3.5).

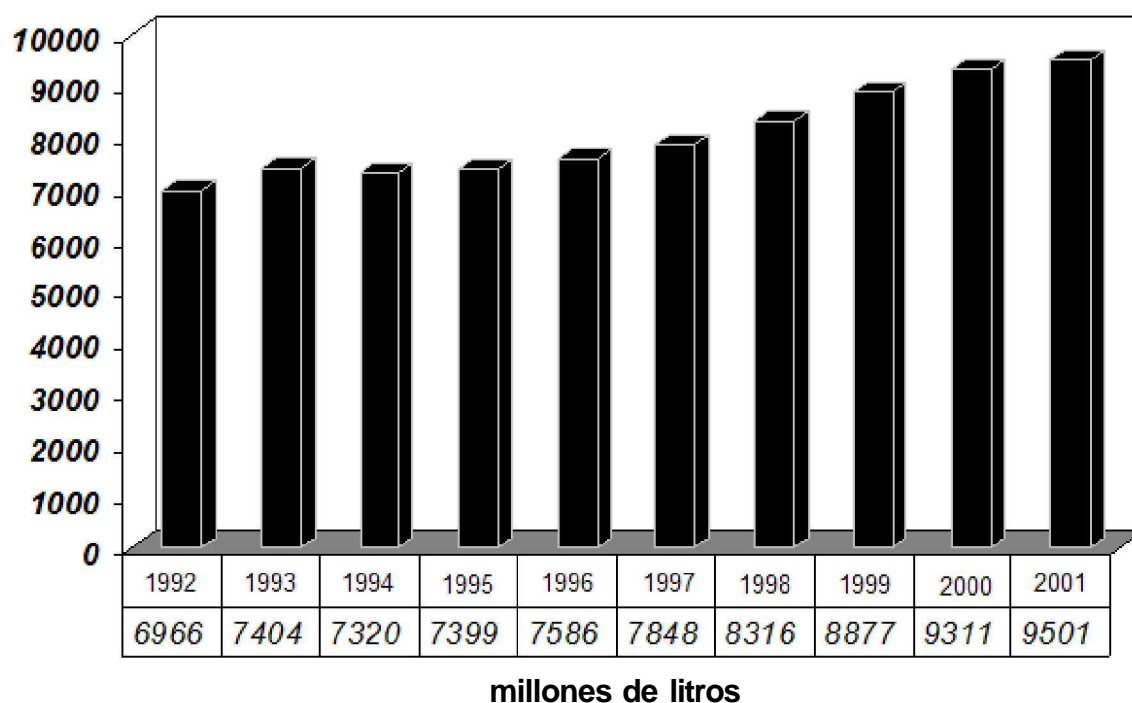


Figura 3.5 Producción de leche de bovino en México en millones de litros (1992-2001) (SAGARPA, 2002).

En México, la producción lechera se desarrolla en todo su territorio, pero durante el periodo analizado (1992-2001) se concentró en seis estados, los que contribuyeron conjuntamente con el 56% de la producción nacional (destacándose Jalisco, Durango y Coahuila, quienes conjuntamente participaron con el 26%). Cabe destacar que en estas dos últimas entidades se encuentra ubicada la Región Lagunera, que es la más importante cuenca lechera del país, y que ocupa el primer lugar en producción a nivel nacional.

Debido a que nuestro país mantiene un déficit en la disponibilidad de leche para consumo interno, los volúmenes de exportación durante el periodo analizado (1992-2001) han sido mínimos, para evitar el desabasto. Únicamente en 1997 se exportaron 857 mil litros de leche fluida, cifra representativa si comparamos los volúmenes de exportación de 1993 (112 mil litros) y de 2001 (170 mil litros).

A su vez las exportaciones de leche en polvo cayeron drásticamente, pues a pesar de que en 1992 solamente se habían exportado 71 toneladas, para 1994 se alcanzaron 5 mil toneladas y en 1997, 4 mil. Sin embargo, para 2001 solamente se alcanzaron 731 toneladas (SAGARPA, 2002).

### 3.4.3 LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS Y LA SUSTENTABILIDAD

La expresión "Calidad de Vida" esta fuertemente ligada al desarrollo humano y a la seguridad alimentaria y por supuesto se encuentra también vinculada al desarrollo sustentable. La calidad de vida hace referencia a la disponibilidad de infraestructuras que mejoran el medio o entorno habitable de los seres humanos. Se trata de un concepto muy amplio, que puede ser considerado desde distintas ópticas y que involucra la alimentación, salud, vivienda, abrigo, consideración comunitaria, sentimiento de realización personal y otras cuestiones.

Específicamente en el área de la alimentación, una alimentación saludable y balanceada contribuye benéficamente sobre el crecimiento, desarrollo, rendimiento escolar y laboral. Además de que ayuda a elevar el nivel de calidad de vida de las personas. Todos los seres humanos necesitamos alimentos inocuos que no dañen al organismo y hablando de seguridad alimentaria necesitamos que todos los países, sociedades, comunidades, familias y consumidores tengan acceso para cubrir las necesidades calóricas y de alimentos variados y nutritivos que provean de energía al organismo y puedan sustentar el crecimiento y el buen funcionamiento de los procesos biológicos.

Por otra parte, es destacable la evolución que ha tenido la industria alimentaria desde hace unos sesenta años y se ha ido incrementando hasta el presente donde se han producido innovaciones tecnológicas, en la producción, conservación, transformación y distribución de los alimentos, sobretodo en el envasado para tener productos de mayor vida de anaquel en los hogares.

Por lo tanto la industria alimentaria tiene un compromiso con el ambiente. La industria de alimentos no aporta cantidades significativas de emisiones a la atmósfera, su producción no requiere de productos altamente contaminantes. Los productos contaminantes de la industria son principalmente envolturas y envases. En el caso específico de la industria de bebidas sus envases pasaron a ser de un 100% de vidrio a un 90% de plástico. Solamente la mayor parte de la rama de las bebidas alcohólicas ha seguido utilizando el vidrio. Los envases de plástico han representado un crecimiento anual del 20% desde 1998. Las envolturas en la industria de alimentos son su principal aporte a la contaminación global, la basura casera ha pasado a ser casi completamente inorgánica y está compuesta en un 70% de envolturas plásticas de alimentos y de otros materiales no biodegradables. Grandes cantidades de agua son usadas en la industria alimentaria ya que se requieren para la limpieza y el tratamiento de los alimentos y es desechada sin recibir tratamiento alguno. La industria azucarera utiliza grandes cantidades de agua y arroja cantidades enormes de humo al igual que la industria de conservas alimenticias (Aguilar, 2001).



La importancia que tiene la industria de alimentos desde el punto de vista económico es incuestionable, es proveedor de alimentos y materias primas.

Tal vez esta rama industrial sea una de las que menos impacto tiene sobre el medio ambiente por la baja emisión de contaminantes y desechos tóxicos, sin embargo hay procesos que la pueden convertir en una industria más limpia disminuyendo la cantidad de externalidades producidas y ésto se lograría con tecnología capaz de usar menos energía eléctrica y agua.

#### **3.4.4 SITUACIÓN DE LA INDUSTRIA LÁCTEA EN MÉXICO**

La industria alimenticia se ubica dentro de la división I (productos alimenticios, bebidas y tabaco) correspondiente con las ramas 11 (carnes y lácteos), 12 (preparación de frutas y legumbres), 13 (molienda de trigo), 14 (molienda de maíz), 15 (beneficio y molienda de café), 16 (azúcar) y 17 (aceites y grasas comestibles), de la actividad económica del INEGI. De este estudio se excluye la rama industrial azucarera, la cual fue tema de desarrollo en un estudio similar al presente. La industria alimenticia se clasifica basándose en sus diferentes procesos para la obtención de sus productos principales.

La industria láctea es aquella que se dedica al tratamiento y envasado de la leche, elaboración de cremas, mantequilla y queso, elaboración de leche condensada, evaporada y en polvo, y otros productos lácteos, tales como yogures y alimentos basándose en leches para niños (tabla 3.7).

Tabla 3.7 Producción de leche en relación al giro de producción

LÁCTEOS		AÑO		
		1996	1997	1998
(Volumen en toneladas, excepto cuando se especifique)				
<b>TRATAMIENTO Y ENVASADO DE LA LECHE</b>				
Leche (miles de litros)	Pasteurizada	98,512	45,198	50,259
	Pasteurizada y homogeneizada	1,775,753	1,880,929	1,961,897
	Ultrapasteurizada	692,882	837,540	898,005
	Rehidratada	710,007	700,340	663,040
<b>Total</b>		<b>3,277,154</b>	<b>3,464,007</b>	<b>3,573,201</b>
Derivados de la leche	Crema o grasas butírica	29,226	32,865	36,993
	Yogur	22,482	33,487	42,448
<b>ELABORACIÓN DE CREMA, MANTEQUILLA Y QUESO</b>				
Crema de leche	Natural	25,222	28,405	31,030
Queso de leche de vaca	Amarillo	16,912	18,365	19,001
	Chihuahua	8,256	9,902	10,366
	Doble crema	10,124	10,590	12,727
	Fresco	38,491	39,000	45,764
	Manchego	16,523	16,720	16,572
	Oaxaca	10,920	11,965	11,923
	Panela	8,306	9,867	10,367
Mantequilla	Mantequilla	12,680	12,097	13,180
Productos a base de grasas vegetales	Margarinas	37,485	41,716	36,592
Yogur o leche búlgara	Al natural	27,799	36,154	46,068
	Con frutas	123,374	141,454	155,684
<b>ELABORACIÓN DE LECHE CONDENSADA, EVAPORADA Y EN POLVO</b>				
Leche en polvo	Entera	311,203	531,767	785,020
	Para lactantes	23,169	25,306	26,885
<b>Total</b>		<b>722,172</b>	<b>999,660</b>	<b>1,300,630</b>

FUENTE: Conagua, 2001

El consumo de agua diario característico reportado por la industria alimenticia tipo láctea se reporta en la tabla 3.8.

Tabla 3.8 Consumo de agua diario característico reportado por la industria alimenticia

Industria láctea	ABASTECIMIENTO	RECIRCULACIÓN	DEMANDA	CONSUMO	DESCARGA
	(m <sup>3</sup> /día)	-REUSO (m <sup>3</sup> /día)	(m <sup>3</sup> /día)	(m <sup>3</sup> /día)	(m <sup>3</sup> /día)
	776	621	1,397	57	718

FUENTE: Conagua, 2001

Los principales contaminantes de la industria láctea, en orden de importancia, se reportan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9 Principales contaminantes de la industria láctea

	DBO	DQO	SST	Grasa y
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	aceites (mg/L)
Industria láctea	829	1,455	388	178

FUENTE: Conagua, 2001

## 3.5 GENERALIDADES DEL ULTRASONIDO

### 3.5.1 CONCEPTO DE ULTRASONIDO

El ultrasonido se refiere a ondas eléctricas en sólidos, líquidos y gases con frecuencias por encima de 20 kHz.

El ultrasonido se divide en dos grupos: ultrasonido de alta intensidad (HIU) y ultrasonido de baja intensidad (LIU). HIU se aplica para modificar algún proceso mientras que el LIU es aplicado para monitorear un proceso o producto. HIU es aplicado a bajas frecuencias (20-300 kHz) para obtener niveles altos de potencia (10-1000 W/cm<sup>2</sup>); por otra parte LIU se usa a altas frecuencias (250 kHz a 1 MHz o más) para lograr una buena resolución, pero bajos niveles de potencia, menos que 1 W/cm<sup>2</sup> (Mulet *et al.*, 2002b).

### 3.5.2 PARÁMETROS DEL ULTRASONIDO

El sonido se puede representar como una curva ondulante, como un senoide y se pueden aplicar los mismos parámetros y magnitudes de una onda.

#### 3.5.2.1 Longitud de onda

La longitud de onda indica el tamaño de una onda, es decir, la distancia entre el principio y el final de una onda completa (ciclo). La longitud de onda  $\lambda$  depende de la frecuencia  $f$  y la velocidad del sonido  $c$  en el medio. Esta dada por la siguiente ecuación:

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (3.1)$$

Entonces la longitud de onda es simplemente la velocidad del sonido dividido por la frecuencia ultrasónica. La importancia de esta relación es que entre más alta es la frecuencia ultrasónica, más pequeña será la longitud de onda. Debido a que la velocidad es constante para cada medio y frecuencia de emisión (si la temperatura es constante) con la fórmula podemos calcular la longitud de onda del haz (Zagzebski, 1996).

### 3.5.2.2 Frecuencia

La frecuencia  $f$  es el número de oscilaciones (ciclos) por unidad de tiempo. Es medida por hertz (Hz), kilohertz (kHz) y megahertz (MHz). Un hertz es un ciclo por segundo o una completa variación por segundo.

Los positivos y negativos medios de un ciclo son compresión y rarefacción, respectivamente. Cuando la presión es más alta el medio es más denso y cuando la presión es más baja, el medio es menos denso (fig. 3.6)

La frecuencia esta dada por la siguiente ecuación:

$$f = \frac{1}{T}$$

Donde  $f$  es la frecuencia y  $T$  es el periodo, es decir, el tiempo que tarda cada ciclo en repetirse.

Lo importante en la ecuación es la relación inversa entre el periodo y la frecuencia. Si la frecuencia se incrementa, el periodo decrece y viceversa (Kremkau, 2002).

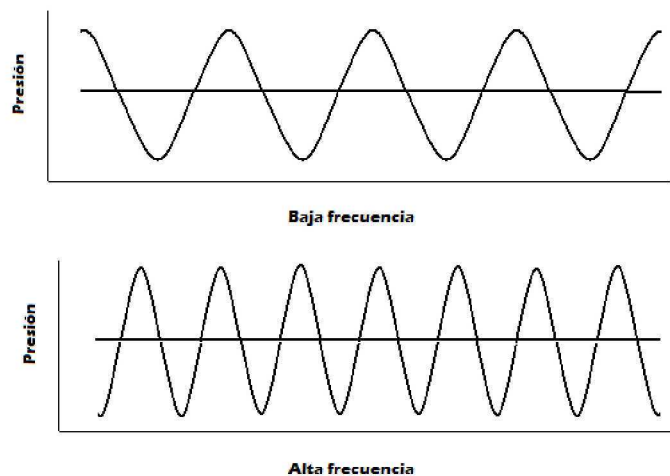


Figura 3.6 Esquema que representa dos diferentes potencias de ondas ultrasónicas

### 3.5.2.3 Amplitud

La amplitud es el pico máximo que alcanza la onda desde su posición inicial, es decir, la altura de la curva. La amplitud indica la cantidad de energía que contiene una onda (Lempriere, 2002).

### 3.5.2.4 Potencia

La potencia acústica es la cantidad de energía radiada por una fuente determinada en forma de ondas por unidad de tiempo. La potencia está determinada por la amplitud de la onda cuanto mayor es la amplitud de la onda mayor es la cantidad de energía que se genera.

### 3.5.2.5 Intensidad

La intensidad de sonido es la cantidad de energía que atraviesa por segundo una superficie. En el ultrasonido es generada por el transductor en forma de rayos. Si se incrementa el área decremента la intensidad, disminuyendo el área incrementa la intensidad porque la potencia está concentrada.

$$INTENSIDAD = \frac{potencia(mW)}{área(cm^2)} \quad (3.3)$$

La ecuación que define a la intensidad es:

$$I = \frac{P^2}{2 \rho c} \quad (3.4)$$

Donde: la intensidad  $I$ , es proporcional al cuadrado de la amplitud en Pascales,  $\rho$  es la densidad del medio y  $c$  es la velocidad del sonido.

### 3.5.2.6 Impedancia

La impedancia es la resistencia que oponen los materiales al paso de una onda ultrasónica. La impedancia acústica de un material,  $Z$ , es igual al producto de la densidad del medio ( $\rho$ ) y su velocidad de sonido ( $c$ ) es:

$$Z = \rho c \quad (3.5)$$

Las unidades para expresarla son kilogramos por metros cuadrados por segundo ( $\text{kg}/\text{m}^2/\text{s}$ ), la cual resulta de multiplicar la densidad por la velocidad también se les da el nombre a esta unidad de rayls (Zagzebski, 1996).

### 3.5.2.7 Atenuación

Cuando una onda ultrasónica viaja a través de un medio, parte de su energía es perdida y transmitida al medio (absorción). La atenuación es una característica de los materiales y da la información de sus propiedades físicas e irregularidades dentro de las muestras. Si se asume que la atenuación es solo una función de la fricción de la viscosidad de corte del líquido, la ecuación clásica usada para estimar la atenuación ( $\alpha$ ) en un líquido es:

$$\alpha = 2\omega^2\mu_T/2\rho v \quad (3.6)$$

Cuando:

$\omega$ = frecuencia ultrasónica radial ( $=2f \Pi$ )

$\mu_T$ = viscosidad de corte

$\rho$ = densidad

$v$ = velocidad

(Mulet *et al*, ,2002b).

Cuando una onda atraviesa un material pierde paulatinamente intensidad como consecuencia de su interacción con el material, es decir, la onda se atenúa. La atenuación se debe a dos mecanismos distintos: absorción y dispersión. En la absorción, parte de la energía de la onda se transforma en energía calorífica del medio, produciéndose una elevación de la temperatura de éste. La dispersión consiste en que parte de la onda es desviada del rayo inicial a consecuencia de las irregularidades del medio (Ortuño, 1996).

Cuando la frecuencia se incrementa la atenuación se incrementa cuando la frecuencia se incrementa la penetración decremента.

### 3.5.3 COMPORTAMIENTO DE LAS ONDAS ULTRASÓNICAS EN LA LECHE

El sonido actúa diferente dependiendo del medio donde se propague debido a las diversas propiedades que presenta como un senoide de esta manera su comportamiento será diverso en agua o en otro fluido alimenticio como en leche. Estudios (Ordoñez *et al.*, 1987; García *et al.*, 1989) muestran como es necesario mayor tiempo de tratamiento para inactivar microorganismos en leche que el necesario para desinfectar agua esto se debe principalmente a dos propiedades que cambian con el tipo de fluido: la impedancia y la atenuación, propiedades que se calcularon según las ecuaciones 3.5 y 3.6.

Tabla 3.10. Parámetros del ultrasonido en leche y agua

Fluido	Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	Velocidad del sonido (m/s)	Impedancia (10 <sup>6</sup> kg/m <sup>2</sup> /s)	Atenuación (m/s <sup>2</sup> )
Agua 20°C	998.23	1482.30	1.4	0.00013
Leche 20°C	1030.00	2050.00	2.1	0.00019

La impedancia es la resistencia que muestra el material al ser atravesado por una onda ultrasónica, por lo tanto, al ser la impedancia mayor en la leche (tabla 3.10) quiere decir que muestra mayor resistencia a la ondas ultrasónicas debido a que tiene mayor cantidad de solutos lo que impide que viajen libremente pues actúan como pared para las ondas.

Mientras que la atenuación o la pérdida de intensidad de las ondas es mayor en leche lo cual se traduce que en este fluido se pierde más intensidad, aproximadamente en un 30% por lo ya antes explicado que en el agua.

### 3.5.4 MECANISMOS Y EFECTOS

El ultrasonido ha demostrado ocasionar cambios en el sistema en el que es irradiado. Los cambios más significativos son:

#### 3.5.4.1 Cavitación

El sonido puede propagarse a través de materiales en diferentes formas. Cuando una onda de sonido se propaga en un medio líquido como una onda longitudinal, este crea ciclos alternos de compresión y expansión o rarefacción (fig. 3.7). Cuando una presión negativa en el líquido, es suficientemente baja para superar fuerzas intermoleculares, pequeñas burbujas son formadas. Durante los siguientes ciclos de compresión y expansión, burbujas de gas se expanden y contraen. La formación y evolución de las burbujas es conocido como cavitación (Mason, 2003).

Durante el proceso de sonicación, se forman ondas longitudinales cuando las ondas sónicas pasan a través de un líquido se crean regiones de compresión y expansión. Estas regiones de cambios de presión causan cavitación y burbujas de gas se forman en el medio. Estas burbujas tienen una extensa área superficial, durante los ciclos de expansión los cuales incrementan la difusión de gas, causando la expansión de las burbujas. Hay un punto en donde la energía ultrasónica irradiada no es suficiente para retener el vapor dentro de la burbuja; por lo tanto una rápida condensación ocurre. Las moléculas colisionan violentamente, creando choques en las ondas; estos choques en las ondas crean regiones a temperaturas muy altas 5500°C y presiones de 50,000 kPa. Los cambios de presión resultantes de esas implosiones son los principales efectos bactericidas en ultrasonido (Piyasena *et al*, 2003).



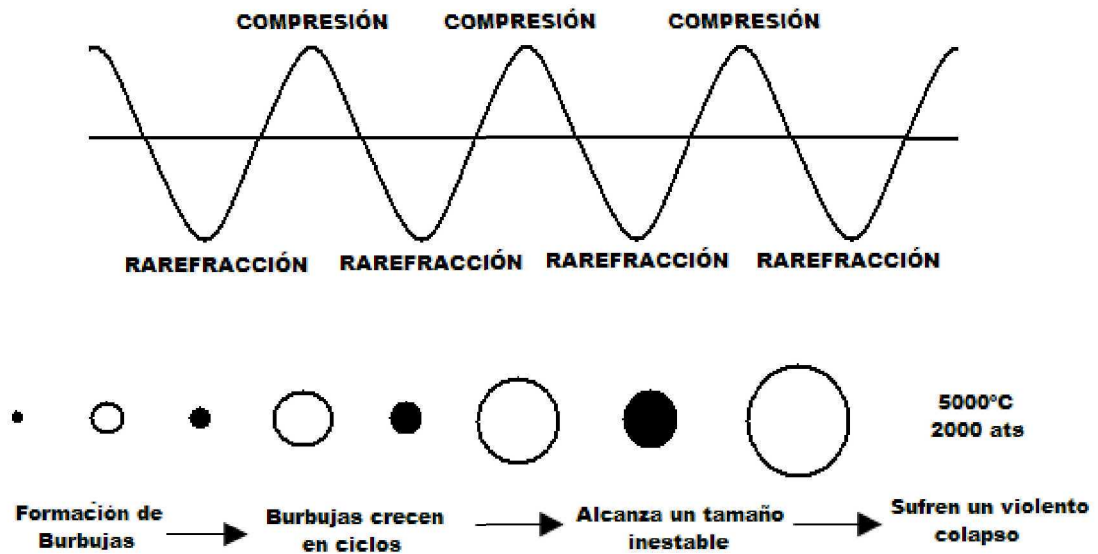


Figura 3.7 Generación acústica de la cavitación de burbujas

Cuando agua es sometida a sonicación, las extremas condiciones generadas sobre el colapso de las burbujas de cavitación son suficientes para causar ruptura de enlace O-H. Este resulta en la formación de especies de radicales y en la producción de oxígeno y peróxido de hidrógeno (Ec. 3.7 a 3.15).



Cualquier especie disuelta en agua estará claramente sujeta a reacciones químicas con los radicales producidos por ultrasonido.

#### **3.5.4.2 Efectos estructurales**

Cuando los fluidos son sometidos a ondas de alta intensidad, la agitación dinámica y el esfuerzo de corte producen efectos estructurales, particularmente su viscosidad. Usualmente los fluidos newtonianos mantienen sus características, pero fluidos dilatantes y tixotrópicos tienden a ser menos viscosos (Kuldiloke, 2002).

#### **3.5.4.3 Turbulencia**

El ultrasonido de alta intensidad en líquidos de baja viscosidad y gases produce una agitación violenta, la cual puede ser usada para dispersar partículas. En las interfases líquido/sólido o gas/sólido las ondas acústicas causan extrema turbulencia conocida como "microstreaming". Este reduce la capa límite, incrementa la convección en la transferencia de masa y acelera la difusión en sistemas donde un mezclado convencional no es posible (Kuldiloke, 2002).

#### **3.5.5 ¿COMO SE PRODUCE EL ULTRASONIDO?**

El ultrasonido es una vibración mecánica y es producido al convertir energía eléctrica a energía mecánica. La conversión de energía eléctrica a energía mecánica se logra aplicando electricidad a un transductor. En general, un transductor es cualquier aparato que convierte una forma de energía a otra. Pero la discusión de la generación de ondas ultrasónicas está restringida a los efectos piezoeléctricos y magnetostrivos del transductor los cuales son generalmente usados para producir el sonido en la región ultrasónica.

Los transductores piezoeléctricos utilizan el fenómeno a través del cual un material cristalino asimétrico producirá una excitación eléctrica cuando un stress mecánico es aplicado a lo largo de un eje particular cristalino. En cambio, al aplicar un campo eléctrico alternativo a través del mismo eje cristalino se comprimirá y relajará produciendo energía vibracional y acústica. Los transductores piezoeléctricos están normalmente hechos de cuarzo o un tipo de cerámica.

La magnetostricción ocurre en ciertos materiales ferromagnéticos y ciertos materiales no metálicos llamados ferritos. Un cambio en dimensión ocurre cuando

una barra de este material está sujeta a un campo magnético. Cuando a un campo magnético alterno se le aplica vibración, energía es producida.

Aunque algunos aparatos usan aire como medio de transferencia a bajas frecuencias, la energía ultrasónica no pasa a través del aire eficazmente a más altas frecuencias. Por lo tanto, un medio de conducción es normalmente usado en conjunción con el transductor para eliminar aire entre el transductor y el ejemplar o medio. El transductor puede estar directamente unido al medio, sumergido en agua con el objeto o una pasta o líquido puede ser usado entre el transductor y el objeto.

Las características ultrasónicas tienen un extenso rango de potencias e intensidades. La potencia ultrasónica (la velocidad a la cual se realiza el trabajo) esta medida en watts. Y la intensidad (Potencia por unidad de área) está media en watts/cm<sup>2</sup> (FDA, 1975).

### **3.5.6 USOS DEL ULTRASONIDO EN LA TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

En años recientes se ha descubierto al ultrasonido como una herramienta para la tecnología de alimentos. El tipo de ultrasonido que se usa en aplicaciones alimenticias es más poderoso y a más bajas frecuencias que el usado en aplicaciones de diagnóstico.

El ultrasonido puede utilizarse como una técnica de procesamiento de alimentos basada en procesos no térmicos que tiene el potencial de destruir microorganismos a temperaturas cercanas a la ambiental evitando cambios debidos al calor, como lo son: el sabor, color y valor nutrimental.

#### **3.5.6.1 Limpieza ultrasónica**

El tratamiento de un fluido con ondas ultrasónicas de frecuencias entre 20 y 100 kHz produce una presión alternante dando lugar a una rápida formación y desintegración de burbujas, obteniéndose como resultado un desprendimiento de energía en el líquido, que produce la agitación del producto.

Esta propiedad de las ondas se utiliza para ablandar contaminantes, como por ejemplo, la arenas en las legumbres, grasa o cera en las frutas y la suciedad en los huevos (Alexandre, 1999).

### **3.5.6.2 Emulsificación**

Una de las más recientes aplicaciones del ultrasonido es la emulsificación. Si una burbuja se colapsa en la fase límite de dos líquidos inmiscibles el resultado del choque de la onda puede traer una mezcla de las capas. Las emulsiones son estables y han sido usadas en la industria textil, farmacéutica, en cosméticos y en la industria alimentaria. Tales emulsiones son muchas veces más estables que las producidas convencionalmente y que requieren surfactantes. Emulsiones con gotas más pequeñas dentro de una escasa distribución son obtenidas cuando se comparan con otros métodos. El grado de emulsificación en productos alimenticios puede también ser estimado midiendo la velocidad del ultrasonido en conjunción con la atenuación. Es posible determinar factores como el grado de cremado de una muestra (Mason, 1996).

### **3.5.6.3 Efecto enzimático**

Uno de los usos originales del ultrasonido en bioquímica era romper las paredes celulares para liberar los contenidos. También se ha demostrado que el poder del ultrasonido puede producir un efecto positivo sobre la actividad enzimática, aunque si la intensidad es demasiado alta las enzimas pueden desnaturalizarse (Mason, 1996).

La inactivación enzimática es un requisito para la estabilización de algunos materiales alimenticios. Aunque esto se puede lograr con tratamientos térmicos, hay algunos casos donde la resistencia de las enzimas al calor puede influenciar negativamente las propiedades alimenticias tales como el sabor, color o valor nutrimental (Mason, 2003).

Un área fructífera de investigación ha sido la activación sonoquímica para inmovilizar enzimas donde el ultrasonido parece ser útil en incrementar el transporte del sustrato de la enzima (Mason, 1996).

### **3.5.6.4 Ultrasonido en los procesos de extracción**

Las clásicas técnicas de extracción con solventes, de materiales que provienen de fuentes vegetales están basadas en la correcta elección del solvente aunado al uso de calor y/o agitación. La extracción de compuestos orgánicos que están contenidos dentro del cuerpo de plantas y semillas se puede mejorar significativamente con un solvente y el uso de ultrasonido. Los efectos mecánicos del ultrasonido proveen una alta penetración del solvente dentro de materiales celulares y mejora la transferencia de masa (Mason, 1996).

#### 4.5.6.5 Cristalización y enfriamiento

Un área muy importante relacionada a la cristalización en la industria alimentaria es la formación de cristales de hielo durante la congelación de agua aunque los cristales pueden dañar la textura de los alimentos. El problema se origina porque los pequeños cristales, los cuales se forman inicialmente dentro del material celular del alimento, continúan creciendo. Como estos cristales van creciendo rompen las paredes celulares dejando una destrucción parcial de la estructura del material. Hay un tiempo considerable de residencia entre el inicio de la cristalización (aproximadamente a  $-3^{\circ}\text{C}$ ) y la congelación completa. Bajo la influencia del ultrasonido se produce una mayor rapidez y el enfriamiento ocurre en un tiempo mucho menor (fig. 3.8) además de que los cristales de hielo son mucho más pequeños y el daño celular se reduce (Mason, 1996).

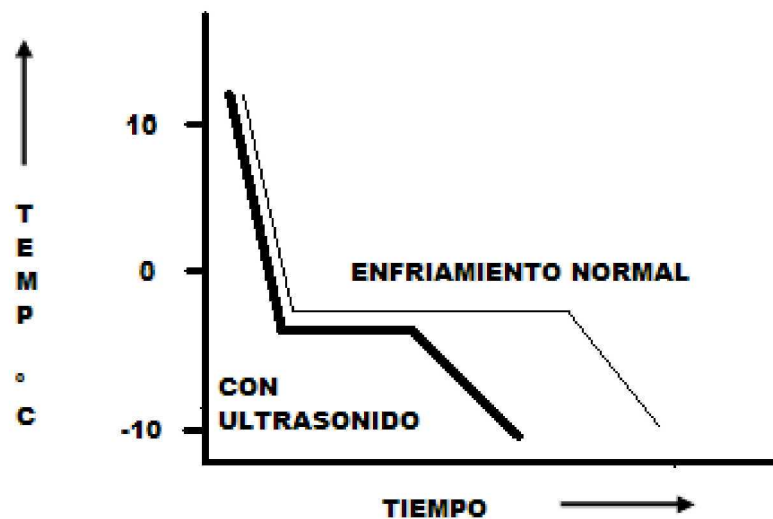


Figura 3.8 Diagrama esquemático del ultrasonido en congelación de alimentos

#### 3.5.6.6 Filtración y secado

El requisito de convertir suspensiones de sólidos a líquidos es común en muchas industrias incluyendo, químicas, ingenieriles y de alimentos. También esta separación puede servir para la producción de sólidos libres en líquidos o para aislar sólidos de licores. La filtración ultrasónica de materia particulada de un líquido puede ser incrementada substancialmente con la aplicación del ultrasonido. Hay dos efectos específicos de la irradiación con ultrasonido que pueden ser aprovechados para mejorar la técnica de filtración: 1) la sonicación

causa aglomeración de partículas finas y permite una filtración más rápida, 2) brinda suficiente energía vibracional para guardar las partículas suspendidas y por lo tanto dejan canales libres para la elusión (Mason, 1996 y Kuldiloke, 2002).

### **3.5.6.7 Estimulación de la actividad en células vivas**

Hay un gran número de ejemplos de los usos del ultrasonido para incrementar la producción de alimentos a través de mejorar la eficiencia de las células completas sin destruir las paredes celulares. Un ejemplo es en el uso del ultrasonido de baja potencia en la activación de un medio nutritivo líquido para aumentar la velocidad de crecimiento de células. Esencialmente ese resulta en un incremento en la producción de proteínas y representa una posibilidad real para la producción de productos alimenticios de fuentes inusuales para el consumo humano o animal.

Ultrasónicamente la estimulación de semillas ofrece la posibilidad de incrementar la producción a larga escala de cultivos y más en la horticultura (Mason, 1996).

### **3.5.6.8 Pruebas de inspección y calidad por ultrasonido**

El ultrasonido también se ha aplicado para controlar tres aspectos principales en el control de la tecnología de alimentos: asegurar la calidad del producto, el control del proceso e inspecciones no destructivas del alimento. Por lo tanto, las aplicaciones industriales incluyen medidas en la concentración, textura y viscosidad (Mulet, 2002b).

La inspección ultrasónica consiste en introducir ondas ultrasónicas a altas frecuencias dentro de materiales y monitorear su comportamiento. Las ondas sonoras están caracterizadas por su frecuencia, velocidad y amplitud, éstas características y su forma de penetración es lo que es medido en los diferentes productos alimenticios (tabla 4.12). La inspección ultrasónica en alimentos está dividida en categorías: medida de velocidad, medida de atenuación.

El uso de estas técnicas ofrece muchas ventajas. La mayor de ella es que son pruebas no destructivas. Las mediciones son rápidas y permiten monitorear el proceso con cambios repentinos y además son precisas (tabla 3.11) (Samari, 1994 y Mulet, 2002a).

Tabla 3.11 Técnicas de medición de ultrasonido en alimentos

CARACTERÍSTICAS	PROPIEDADES DEL MATERIAL A OBTENER	TÉCNICA USADA
Velocidad y atenuación del sonido en huevos.	Blancura del huevo.	Pocos MHz
Velocidad del sonido en frutas y verduras.	Textura y madurez.	30 – 50 kHz
Velocidad del sonido y densidad en proteínas.	Compresibilidad adiabática e hidrofobicidad de las proteínas.	Pocos MHz
Velocidad del sonido medido durante el enfriamiento de agua, grasas, emulsiones y dispersiones.	Fracción del volumen de cristales, temperatura de la fase de transición.	Pocos MHz
Amplitud y fase de corte en geles.	Rigidez.	Pocos MHz
Amplitud de las ondas de compresión como una función de frecuencias en proteínas de leche y emulsiones aceite-agua.	Distribución del tamaño de las partículas, agregación.	1-200 MHz

FUENTE: Povey, 1998a

El ultrasonido decrece en intensidad y cambios de fase si este se propaga a través e interacciona con un sistema líquido continuo. El decremento en intensidad es usualmente referido a la atenuación ultrasónica. La fase está relacionada con la velocidad de propagación del ultrasonido a través de un sistema líquido particular. La variación de esas dos propiedades (atenuación y velocidad del sonido) depende de las propiedades del sistema líquido. Si se mide la variación de esas propiedades ultrasónicas entonces será capaz de extraer información acerca de las propiedades del sistema (Dukhin *et al*, 2005).

### 3.5.6.9 Inactivación de microorganismos

Las técnicas térmicas convencionales de pasteurización y esterilización son las más comunes y son usadas para inactivar microorganismos en alimentos, sin embargo, nuevos métodos han surgido teniendo un menor impacto en el valor nutricional y en la calidad alimenticia. Estas técnicas son llamadas "técnicas de alimentos mínimamente procesados"; es un concepto que describe un acercamiento con la seguridad alimentaria y la conservación. Esos procesos necesitan en su mayoría, menos energía y por lo tanto más costo-eficiencia y ser ambientalmente más amigables que las técnicas térmicas convencionales (Piyasena *et al.*, 2003 y Ross *et al.*, 2003).

La eliminación de microorganismos es un área de incremento entre los consumidores. Una destrucción microbiana efectiva es imperativa en procesos alimentarios, un único reporte de contaminación podría ser la reputación y un futuro exitoso de un fabricante en riesgo. Una industria puede reducir la contaminación inicial, inactivando cualquier microorganismo presente en el alimento. La radiación ultrasónica ha demostrado tener una potencia alta para ser usada en la inactivación de poblaciones bacterianas (Piyasena *et al.*, 2003).

La investigación del ultrasonido como un método potencial para la inactivación microbiana comenzó en los 60's, después de descubrirse que las ondas ultrasónicas fueron usadas contra submarinos y mataron peces. El mecanismo para matar microorganismos es principalmente debido al adelgazamiento de las membranas celulares, calor y producción de radicales libres.

La efectividad del tratamiento de ultrasonido depende del tipo de bacteria tratada. Los microorganismos, especialmente los esporulados, son relativamente resistentes a los efectos, por lo que sería necesario periodos más largos de ultrasonicación para obtener un producto inocuo.

Otros factores conocidos por afectar la efectividad de la inactivación microbiana son la amplitud de las ondas, tiempo de contacto/exposición, volumen del producto a ser procesado, la composición del tratamiento y la temperatura del tratamiento (Piyasena *et al.*, 2003).

### **3.5.7 APLICACIONES DEL ULTRASONIDO EN ALIMENTOS**

#### **3.5.7.1 Granos de arroz**

Un gran número de efectos mecánicos y físicos pueden resultar cuando un material en un medio líquido es sometido a sonicación. Por ejemplo en un grano se puede erosionar en la superficie o se puede reducir el tamaño del grano.

Si los granos de arroz son suspendidos en agua son sometidos a sonicación la destrucción de la vaina y la fragmentación del gránulo serían más rápidas. Ambos efectos resultarían en una liberación más rápida del almidón durante el cocinado en un periodo más corto de tiempo para formar un gel (Povey, 1998b).

#### **3.5.7.2 Carne**



El ultrasonido de alta intensidad provoca cambios físicos y químicos sobre las propiedades de la carne y productos cárnicos. La tenderización o rigidez de la carne esta influenciada por la composición, organización estructural y la integridad del músculo. Los dos componentes estructurales que determinan la fuerza intrínseca de la carne son las proteínas estructurales y el tejido conectivo. El ultrasonido ha probado ser una alternativa para ablandar la carne después de un periodo corto de tiempo (Jayasooriya *et al.*, 2004).

### **3.5.7.3 Productos congelados**

La potencia del ultrasonido también puede beneficiar la producción de productos congelados, como helados, paletas de hielo, etc. debido a que la sonicación puede reducir el tamaño del cristal. Investigaciones experimentales demuestran que durante la producción de paletas de hielo, la aplicación de la potencia del ultrasonido resulta en la producción que ha tenido cristales de hielo mucho más pequeños y la distribución uniforme de los cristales de hielo (Zheng, 2006).

### **3.5.7.4 Jugos de frutas**

La enzima más estable al calor es la pectinesterasa. Esta enzima induce la desestabilización de la pectina, la cual causa turbidez en los jugos. Kuldiloke, (2002) encontró que la inactivación de la pectinesterasa por ondas ultrasónicas depende del tiempo de exposición, temperatura, presión y pH del medio, así como la amplitud del ultrasonido. La inactivación es irreversible y la enzima no se reactiva durante el ultrasonido.

### **3.5.7.5 Té**

La extracción de té sólido de hojas es comercialmente importante porque es el punto de inicio para la producción de té instantáneo. El té instantáneo es un polvo derivado de la infusión de té puro desde el cual agua se removió por secado. El uso del ultrasonido mejora la extracción a 60°C aproximadamente en un 20%. La efectividad para la extracción ultrasónica es más grande que la extracción térmica y el tiempo es reducido, la mayor parte de la extracción de los materiales es en los primeros diez minutos de sonicación (Mason, 1996).

### **3.5.8.6 Jarabe**

El ultrasonido fue aplicado para mejorar la calidad y cantidad de un tipo de jarabe iraní que se extrae de los dátiles, el cual tiene problemas de alta carga microbiana en su proceso tradicional de producción. Los resultados mostraron que la ultrasonicación incrementa el producto extraído en un tiempo más corto con una mejor calidad organoléptica, además decreta el conteo microbiano en comparación con el método clásico de extracción (Entezari *et al.*, 2004).

### 3.5.7.7 Lácteos

Las aplicaciones actuales del ultrasonido a la industria láctea son:

#### 3.5.7.7.1 Yogurt

La producción de yogurt es un proceso importante dentro de la industria alimentaria. Investigaciones recientes han demostrado que el uso del ultrasonido puede ayudar a reducir el tiempo de producción de este producto hasta en un 40%. Un descubrimiento importante fue que la sonicación reduce la dependencia normal del proceso de origen de la leche. Además, la sonicación mejora la consistencia y textura del producto (Mason, 1996).

#### 3.5.7.7.2 Queso

- Evaluar propiedades Teológicas y texturales.
- Composición de la leche.

#### 3.5.7.7.3 Leche

- Identificar adulteración en diferentes tipos de leche por adición de agua.
- Cambios en la coagulación utilizando 1 MHz.
- Desinfección en la leche envasada. Se utilizaron frecuencias que no excedieron de 5 MHz, encontrando que la óptima es de 3.75 MHz.  
Decreto de la inoculación en el caso de *Staphylococcus epidermis* y *Bacillus subtilis*.
- Inactivación de *Listeria Innocua* a una temperatura constante de 63°C.
- Homogenización de la leche a una frecuencia constante de 20 kHz.

Dukhin, (2005) caracterizó productos lácteos mediante ultrasonido, incluyendo caracterización del contenido de grasa en una extensa variedad de lácteos, cuantificación del tamaño de glóbulo de grasa y calcular el tamaño de las partículas de agua en mantequilla.

### 3.5.8 EFECTIVIDAD DEL ULTRASONIDO COMBINADO CON OTRAS TÉCNICAS

La efectividad del ultrasonido en la conservación de alimentos puede ser incrementado por la combinación con otros tratamientos. La resistencia de microorganismos y enzimas al ultrasonido es muy alta y puede requerir de varias horas ultrasonificación para lograr los resultados deseados. Para incrementar la efectividad de la conservación de los alimentos por ultrasonido puede ser combinado con calor y presión.

El uso del ultrasonido con calor moderado, simultáneamente es conocido como Termosonicación (TS). Una combinación del ultrasonido y presión moderada se llama Manosonicación (MS), este usa presiones moderadas desde 100 hasta 300 kPa a baja temperatura y finalmente la combinación de calor, irradiación ultrasónica y presión moderada se le conoce como Manotermosonicación (MTS).

Es necesario hacer una distinción entre Presonicación (PS) y Postsonicación (PTS), el primero se refiere a que el producto es pretratado con ultrasonido antes de ser sometido a un tratamiento de presión y/o temperatura; mientras que la postsonicación se refiere a que el producto es tratado antes de someterse al ultrasonido (Kuldiloke, 2003 y Mason, 2003).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 MICROORGANISMOS

Las Bacterias utilizadas: *Escherichia coli* (fig. 4.1) y *Staphylococcus aureus* (fig. 4.2), fueron obtenidas del cepano del laboratorio de microbiología de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Las cepas se conservaron en tubos con agar inclinado, en refrigeración a 4°C

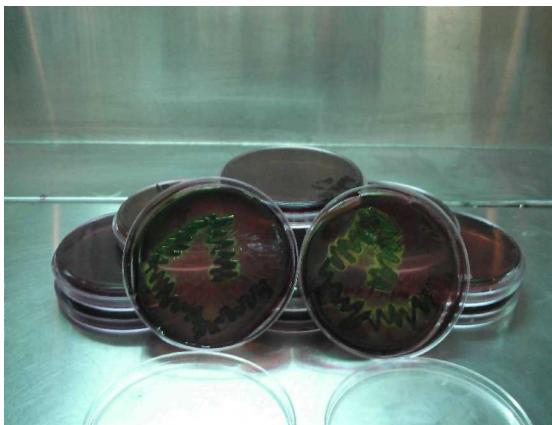


Figura 4.1. Cepa de *E. coli*



Figura 4.2. Cepa de *S. aureus*

### 4.2 MUESTRAS DE LECHE

La leche utilizada para el tratamiento ultrasónico fue leche ultrapasteurizada de una marca comercial envasada en tetrapak; para asegurarse de que la leche no contenía microorganismos, se realizó cuenta en placa con agar EMB.

La leche ultrapasteurizada ya está sometida a tratamientos físicos y su estructura ya ha sido modificada, por lo cual para las pruebas de color, viscosidad, glóbulos de grasa y azul de metileno se utilizó leche bronca, obtenida de un establo del municipio de Naucalpan, Estado de México.

La prueba de azul de metileno también se realizó tratada por pasteurización rápida, comprada en el supermercado, esta leche se conoce como leche envasada en cartón.

### 4.3 MEDIOS DE CULTIVO

Para *Escherichia coli*:

- Caldo lactosado biliado verde brillante o Caldo Brila de Merck (código 1.05454)
- Agar Eosin-Azul de metileno o Agar EMB (código 1.01347)
- Caldo nutritivo de Becton Dickinson (código 234000) y agar bacteriológico de Bioxon (código 215000); éstos para formar agar nutritivo.

Para *Staphylococcus aureus*:

- Caldo nutritivo de Becton Dickinson (código 234000) y agar bacteriológico de Bioxon (código 215000); éstos para formar agar nutritivo.

### 4.4 PREPARACIÓN DEL INOCULO

Para *Escherichia coli* se tomó una porción de colonia con un asa y se sembró por estría en cajas Petri con agar EMB, se incubó durante 24 h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ; posteriormente, de estas cajas se tomó una colonia por medio de un asa y se inocularon en 10 mL de Caldo Brila, posteriormente se incubó durante 13 h a  $37 + 1^\circ\text{C}$ ; el crecimiento se observó por la formación de  $\text{CO}_2$  y turbidez del medio.

Para *Staphylococcus aureus* se siguió el mismo procedimiento, solo se modificó el caldo de cultivo por caldo nutritivo y su crecimiento se observó por la turbidez del medio.

## 4.5 INOCULACIÓN DE LA LECHE

Para las pruebas de leche, 60 mL de leche contenidos en un vaso de precipitado de 100 mL, se inocularon con 1 mL del inóculo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* obtenido como se indicó en el punto anterior

## 4.6 CONTEO DE MICROORGANISMOS

La cuenta de microorganismos se realizó por dos métodos indirectos: cuenta en placa y número más probable (NMP).

### 4.6.1 CUENTA EN PLACA

En condiciones estériles se trabajó en campana de flujo laminar, se adicionó 1 mL de muestra de leche a un tubo de dilución con tapa de rosca con 9 mL de solución salina 0.09% (dilución  $10^{-1}$ ). Y posteriormente se homogenizó con la ayuda de un vórtex. De esta dilución se tomó 1 mL y se transfirió a otro tubo con 9 mL de solución salina estéril 0.09% (dilución  $10^{-2}$ ). De ahí se hicieron diluciones sucesivas hasta completar diluciones decimales necesarias, hasta  $10^{-4}$  (esta técnica se utilizó como refuerzo del NMP para ver si ya no crecían más bacterias), asegurándose de utilizar una punta o pipeta estéril diferente en cada paso. Se agitó de forma constante con vórtex en cada paso.

Posteriormente se inoculó con 0.1 mL de la dilución seleccionada en el centro de la superficie del medio de cultivo seleccionado para el crecimiento. Se realizó por triplicado cada dilución para asegurar la cuenta. El inóculo se esparció por toda la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por la flama del mechero permitiendo su enfriamiento). Asegurando una distribución homogénea por toda la superficie del medio. Una vez inoculadas las cajas de Petri se incuban de forma invertida a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Después de un periodo de incubación (de 3 días), se contó el número de colonias y reportó como unidades formadoras de colonias (UFC)/ mL de leche.

Los cálculos son los siguientes:

$$\text{UFC/mL} = (\text{NC} * 1/\text{FD} * 1/\text{V}) / \text{VM}$$

Donde:

UFC/ mL. = unidades formadoras de colonias / mL de leche

NC = número de colonias en una caja

FD = factor de dilución que corresponde a la dilución de donde se tomó la muestra con la que se inocula la caja (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-10</sup>)

V = volumen inoculado en la caja = 0.1 ml

VM = Volumen de la muestra

#### 4.6.2 NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

De la misma forma que para cuenta en placa se tomó 1 mL de muestra de leche y se hicieron diluciones en serie hasta la dilución 10<sup>-7</sup>. Posteriormente con cada una de las soluciones, se adicionó 1 mL de la dilución correspondiente a 3 tubos con 9 ml de caldo Brila esto para cada dilución, los cuales tenían una campana Durham (fig 4.3), para determinar la producción de CO<sub>2</sub>; para *E. coli*, y con caldo nutritivo y sin campana para *S. aureus*. Posteriormente los tubos se incubaron a 37 ± 1°C. Los datos fueron tratados según el método del Número Más Probable (NOM 112, 1994). Determinando el crecimiento por turbidez en el medio en ambos caso y para *E. coli* también la producción de CO<sub>2</sub>. Este procedimiento se realizó antes y después del tratamiento ultrasónico para llevar el conteo cuantas bacterias se inoculaban y cuantas quedaban después de la sonicación.

Y los cálculos son los siguientes:

Dependiendo de las respuestas obtenidas en las tablas de la NOM-112, se utiliza el siguiente procedimiento para calcular el número de microorganismos más probables por mL de leche:

$$\text{NMP/mL} = V_t * \text{FD}$$

NMP/mL leche = Número Más Probable de microorganismos por mL

V<sub>t</sub> = Valor de tablas

FD = Factor de la primera dilución

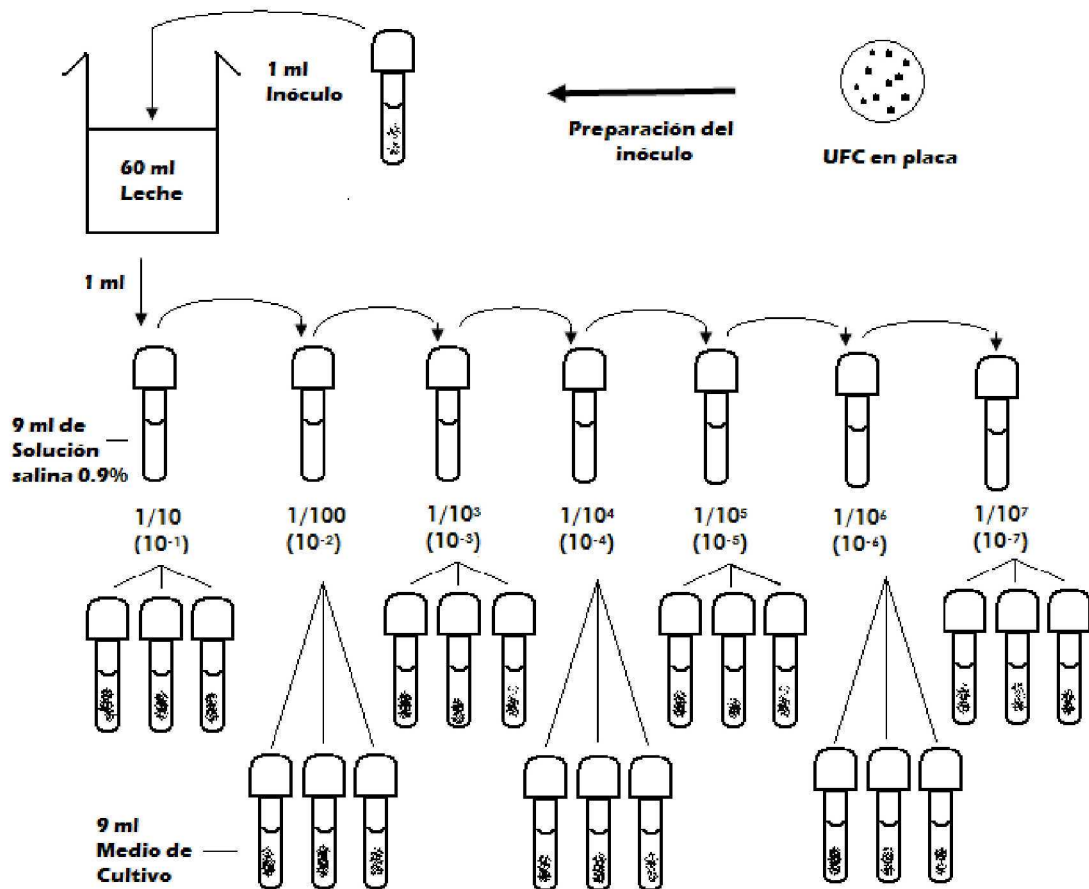


Figura 4.3 Procedimiento esquemático del tratamiento microbiológico NMP.

## 4.7 TRATAMIENTO ULTRASÓNICO DE LA LECHE

El tratamiento ultrasónico de alta intensidad fue llevado a cabo usando un equipo de emisor de ultrasonido 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific). Esta unidad está compuesta por un generador de frecuencia o convertidor, un transductor piezoeléctrico de titanio zirconato y un sonotrodo (fig. 4.4). El sonotrodo emite vibraciones a una frecuencia de 22 kHz, con un controlador de potencia que se puede variar de 0 a 17 W. Todos los experimentos se realizaron a una potencia de 4 W.

Se colocaron 60 mL de leche ultrapasteurizada en vasos de 100 mL, inoculadas con 1 mL. Las muestras fueron irradiadas durante diferentes tiempos: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos por triplicado.





Figura 4.4 Equipo emisor de ultrasonido (60 Sonic Dismembrator) con sonotrodo sumergido en una muestra de 60 mL de leche.

#### 4.8 TRATAMIENTO TERMOULTRASÓNICO DE LA LECHE

El tratamiento termoultrasónico se realizó a tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C. Los tratamientos se llevaron a cabo de la misma forma explicada en el punto 4.7, se hizo mediante una postsonicación, es decir, se calentó primero la muestra mediante una parrilla y después se sonicaron las muestras; para controlar la temperatura, se sumergió la leche en baño maría a 40, 50 ó 60°C y se realizó la irradiación ultrasónica en la incubadora a la temperatura correspondiente. Se siguió el procedimiento mencionado en el punto 4.6 para el conteo de microorganismos antes y después del tratamiento termoultrasónicos. Todas las pruebas y conteos se realizaron por triplicado.

#### 4.9 EVALUACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO DEL EQUIPO DE ULTRASONIDO

Para verificar la generación del fenómeno de cavitación por parte del equipo emisor de ultrasonido se midieron dos parámetros que sufren un cambio por la implosión de burbujas, la temperatura y el pH. El estudio se realizó con muestras de 60 mL de una solución de yoduro de potasio 0.06M en vasos de precipitados de 100 mL. El pH y la temperatura se midieron con un equipo portátil WTW pH

330 a los diferentes tiempos de irradiación 0, 1,2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 minutos. Todas las pruebas se hicieron por triplicado.

El monitoreo de los cambios en pH y temperatura también se midieron sustituyendo la solución de KI 0.06M por leche, bajo las mismas condiciones de operación.

#### **4.10 OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***

Para cada microorganismo estudiado se determinó la curva de crecimiento microbiano por densidad óptica a 540 nm utilizando un espectrofotómetro marca Milton-Roy modelo 21D. Para *Escherichia coli* se preparó el inóculo como se explicó anteriormente, pero en mayor cantidad, colocando 15 colonias de igual tamaño en un tubo de ensaye que contenía 15 mL de solución salina al 0.09% y se homogenizaron perfectamente. Posteriormente se inocularon con 1 mL cada uno de 15 tubos de ensaye que contenían 9 mL de caldo Brila. Posteriormente se incubaron a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , y se midió el crecimiento en 15 tiempos diferentes uno por tubo (de 0 a 14 horas), cada uno era destructivo. Para *S. aureus* se realizó la misma técnica pero en caldo nutritivo, al igual que para *E. coli* las pruebas se realizaron por triplicado.

Para todas las pruebas descritas a continuación se utilizó leche bronca.

#### **4.11 DETERMINACIÓN RÁPIDA DE LA CALIDAD MICROBIANA DE LA LECHE BRONCA MEDIANTE LA PRUEBA DE AZUL DE METILENO**

Se colocaron en tubos de ensaye estériles 10 mL de cada uno de los tratamientos (leche bronca tratada con calor y ultrasonido durante: 35 min a  $23^\circ\text{C}$ , a 15 y 35 min a  $40^\circ\text{C}$ , a 15 y 35 min a  $50^\circ\text{C}$ , a 15 y 35 min a  $60^\circ\text{C}$ ) y de: leche bronca, leche comercial de pasteurización rápida, leche UHT no tratadas. A cada uno de los tubos de ensaye que contenían las muestras se les agregó 1 mL de indicador estéril y posteriormente se incubaron a  $37 + 1^\circ\text{C}$ . El indicador esta constituido por 5 mg de azul de metileno disuelto en 100 mL de agua estéril. A intervalos regulares se monitorea el color de la mezcla para observar como la leche teñida de azul regresaba al color blanco, tomando el tiempo requerido para el cambio de color. Las pruebas se realizaron por triplicado

## **4.12 DETERMINACIÓN DEL COLOR EN LA LECHE BRONCA**

El color se determinó en cada una de las muestras de leche bronca tratadas mediante ultrasonido para cada uno de los tiempos (0 a 35 minutos), a temperatura ambiente, mediante un colorímetro marca Minolta CT-300 usando el sistema de medición de la CIE (1931). Las pruebas se realizaron por triplicado. El equipo lo proporcionó el laboratorio de Análisis de Alimentos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

## **4.13 DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD EN LA LECHE BRONCA**

La viscosidad fue determinada mediante un viscosímetro de Ostwald (fig. 4.5). El viscosímetro se sumergió en agua a 23°C para controlar la temperatura; se llenó cuidadosamente con el fluido a medir hasta el nivel de la marca A, el fluido se succionó por el otro extremo, a través del tubo capilar más arriba de la marca B. El fluido cae por el tubo capilar bajo la influencia de la presión hidrostática. Se registró el tiempo que tarda el fluido en caer entre las marcas B y C conforme fluye del tubo capilar. Esta operación se realizó por triplicado con cada una de las muestras de leche tratadas a diferentes tiempos (0 a 35 minutos). Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

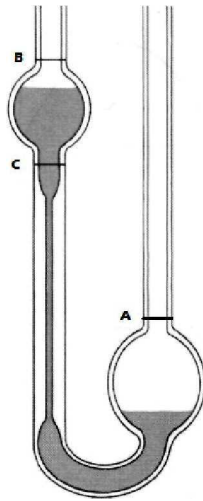


Figura 4.5 Representación del viscosímetro Ostwald.

#### 4.14 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD EN LA LECHE BRONCA

Se determinó la densidad de la leche después de sonicarla a diferentes tiempos de tratamiento (0 a 35 min) a una temperatura constante de 23°C. Se colocaron de 10 mL de leche en un matraz volumétrico del mismo volumen y se pesaron para así ver el peso de este volumen de esta manera se calculó masa sobre volumen la densidad. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

#### 4.15 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GLÓBULO DE GRASA EN LA LECHE BRONCA

Las muestras de tratada a diferentes tiempos de irradiación (0 a 35 minutos) fueron agitadas manualmente para homogenizar y evitar aglomeración de la grasa y a una temperatura de 23°C se colocó una gota de cada una de ellas en un portaobjetos sin ayuda de cubreobjetos para ser analizadas bajo un microscopio

óptico Olympus CX31 a 100x de aumento. El microscopio óptico estaba equipado con una cámara fotográfica así que de cada muestra se tomaron 3 fotografías y en cada fotografía se midió el diámetro de 20 diferentes glóbulos leche bronca de grasa (fig. 4.6). Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Propiedades Reológicas y Funcionales en Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.



Figura 4.6 Microscopio óptico equipado con cámara fotográfica para la medición de los glóbulos de grasa en leche.

## 4.16 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA EN LECHE BRONCA

### 4.16.1 ELECTROFORESIS

La proteína de la leche fue determinada por electroforesis en gel de Acril-Bisacrilamida con una cámara de electroforesis Bio-Rad de Fisher Biotech (fig. 4.7), el procedimiento fue tomado de Toral Peña, (2004). Las muestras a las que se les determinó proteína fueron las irradiadas a 0, 5, 10, 15, 20 y 35 min. El

comportamiento electroforético de las proteínas se realizó por triplicado. Las pruebas se realizaron por triplicado. El equipo lo proporcionó el laboratorio de Análisis de Alimentos en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

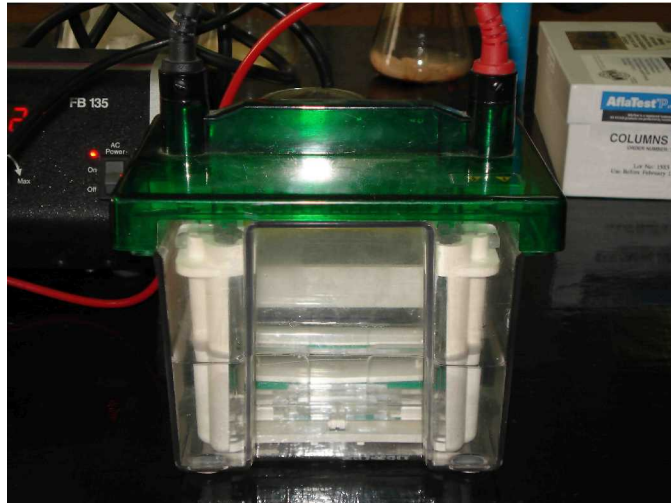


Figura 4.7 Cámara de electroforesis utilizada para la determinación de proteína

#### 4.16.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA (EXTRACCIÓN PROTEICA)

Para la extracción de la proteína en la leche se pesaron 25 g de leche, se le adicionó 100 mL de NaCl 1M y se homogenizó en licuadora durante 1 min. Posteriormente se tomaron 25 mL de la muestra licuada y se le adicionaron nuevamente 25 mL de NaCl 1M. La mezcla anterior se centrifugó a 3500 rpm en una centrífuga marca Beckman #349702 durante 45 min. Obteniéndose tres capas, grasa, solución salina + proteína y sólidos, (fig. 4.8):

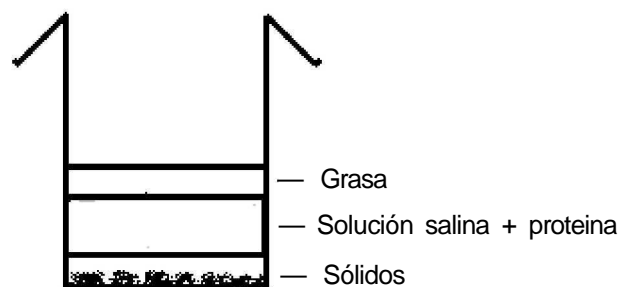


Figura 4.8 Representación esquemática de la separación de capas en la muestra centrifugada con solución salina

Con la ayuda de una pipeta se extrajo la capa de solución salina + proteína y se le adicionaron 50 mL de alcohol etílico concentrado y frío a 4°C. Esta mezcla se dejó en refrigeración toda la noche. Al día siguiente se separó por decantación el precipitado que resultó de la mezcla en reposo y refrigeración y este precipitado se centrifugó en tubos Ependorf a 5000 rpm en una minicentrífuga BioRad durante 5 min. Se obtuvieron dos capas, solución salina + alcohol y proteína (fig. 4.9):



Figura 4.9 Representación esquemática de la separación de capas en la muestra centrifugada con alcohol

Se retiró la capa superior mediante decantación y la capa inferior o proteína se resuspendió en agua destilada se volvió a centrifugar a 5000 rpm en la microcentrífuga durante 3 minutos y esta mezcla se utilizó en la electroforesis (Arzate Aguilera y Flores Arrieta, 2003).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 EVALUACIÓN DEL EQUIPO DE ULTRASONIDO

#### 5.1.1 EFECTO DEL ULTRASONIDO EN EL pH Y LA TEMPERATURA EN LA SOLUCIÓN DE YODURO DE POTASIO.

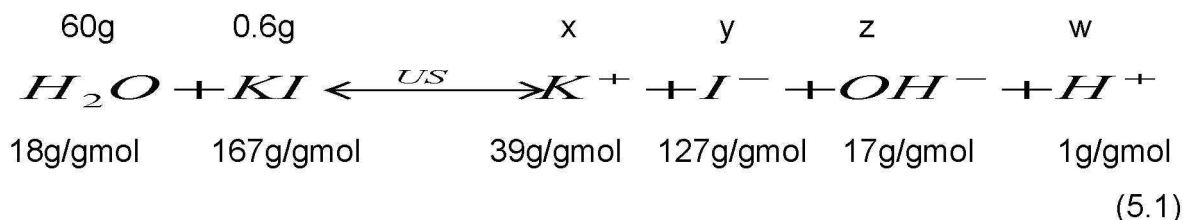
Una forma indirecta de verificar el funcionamiento del equipo de ultrasonido es por el aumento de la temperatura y los cambios de pH que se presentan en el medio, que son causados por el fenómeno de cavitación. Se observó un aumento de la temperatura conforme aumentó el tiempo de irradiación, así a los 35 minutos de irradiación ultrasónica se alcanzó un aumento de 13°C (fig. 5.1). Esta elevación de temperatura es consecuencia del viaje de las ondas ultrasónicas a través del medio líquido con yoduro de potasio ya que una porción de la energía sónica es transferida al medio y convertida en calor (Madge y Jensen, 2002).

Se decidió trabajar con yoduro de potasio debido a la flexibilidad que ofrece este compuesto para el estudio del comportamiento de la formación de iones en el agua debido a la irradiación ultrasónica. Se ha estudiado que la irradiación de ondas ultrasónicas al agua provoca la generación de radicales  $H^+$  y  $OH^-$  como una consecuencia de la presencia del fenómeno de cavitación.

En el presente trabajo de investigación, se decidió verificar de manera indirecta la formación de las especies  $H^+$  y  $OH^-$  por medio de los cambios provocados al pH del medio estudiado.

En la figura 5.1 se observa que existen ligeros cambios en el pH del KI 0.06M, y estos cambios se atribuyen a la formación de los radicales libres expresados en la ecuación 5.1.





Dentro de los primeros 4 minutos de irradiación ultrasónica, se observa una ligera tendencia a la disminución en el valor del pH, que a partir del minuto 5 se revierte, para posteriormente volver a disminuir a partir del minuto 20. Para explicar el fenómeno suscitado en la figura 5.1, se procedió a realizar un análisis estequiométrico de la reacción generada.

Las cantidades generadas de los productos  $\text{K}^+$  (x),  $\text{I}^-$  (y),  $\text{OH}^-$  (z) y  $\text{H}^+$  (w) se representan en las ecuaciones 5.2 a 5.5.

$$x = \frac{(39\text{g/gmol}) * (0.6\text{g})}{167\text{g/gmol}} = 0.14\text{g} \tag{5.2}$$

$$y = \frac{(127\text{g/gmol}) * (0.6\text{g})}{167\text{g/gmol}} = 0.46\text{g} \tag{5.3}$$

$$z = \frac{(1\text{g/gmol}) * (0.6\text{g})}{167\text{g/gmol}} = 0.004\text{g} \tag{5.4}$$

$$w = \frac{(17\text{g/gmol}) * (0.6\text{g})}{167\text{g/gmol}} = 0.06\text{g} \tag{5.5}$$

A partir de las ecuaciones (5.2), (5.3), (5.4) y (5.5) se puede mencionar que existe una importante formación del radical  $\text{H}^+$ , lo cual puede ser asociado al comportamiento descendiente del valor del pH dentro de los primeros 4 min de reacción, además de reafirmar el efecto de la cavitación sobre la producción de radicales libres (Olvera, 2005).

Es probable que se presente la formación de la especie HI por parte de los dos radicales que se presentan en mayor cantidad. Esta formación posiblemente se

presenta en periodos dentro de la escala de los microsegundos, y posteriormente se revierte la reacción. Este es otro factor al cual puede atribuirse el cambio del pH presente en los primeros minutos de irradiación ultrasónica.

La etapa comprendida del minuto 4 al minuto 20 puede atribuirse a que la reacción, al ser reversible, busca su estado más estable, tratando de volver a su estado inicial. De acuerdo con estudios realizados (Mark, *et. al.*, 1998), se tiene valorado que a lo largo del tiempo existe una mayor formación del producto OH<sup>-</sup>, explicando de esta forma el aumento del pH durante este periodo.

Hiraoka *et al*, (2005) estudió la formación de radicales libres a consecuencia de irradiaciones ultrasónicas y demostró la aparición de radicales libres desde el primer minuto de sonicación; también encontró que a los 5 minutos de irradiación es cuando se alcanza la mayor formación de radicales hidroxilo. En esta experimentación, a los 5 minutos de sonicación es donde comienza a aumentar el pH, lo cual puede deberse a la formación de OH<sup>-</sup>.

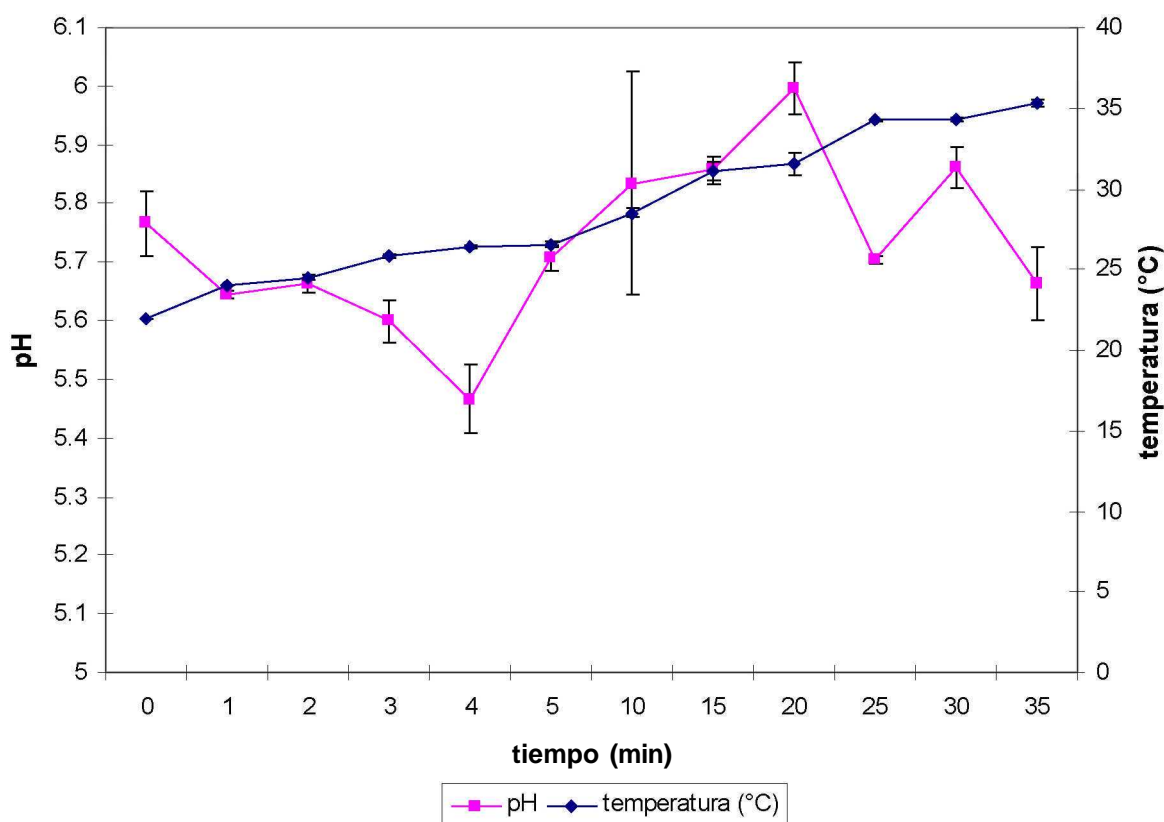


Figura 5.1 Efecto del ultrasonido en el pH y la temperatura de una solución KI 0.06M por irradiación ultrasónica de 22 MHz por tiempos de 0 a 35 min

## 5.2 EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA VARIACIÓN DEL pH Y TEMPERATURA DE LA LECHE

Las muestras de leche irradiadas mostraron variaciones en el pH y la temperatura (fig. 5.2). Al igual que en el agua, en la leche se presentó aumento de la temperatura; que fue de casi 13°C después de 35 min de tratamiento. La leche tiene un pH que tiende a ser neutro debido a que está constituida en su mayor parte por agua, (casi 90%), la leche al ser tratada presentó una pequeña variación del pH entre 6.7 y 6.85, sin seguir un comportamiento regular en función del tiempo de tratamiento, como el efecto en la solución de KI (figs. 5.1 y 5.2). Estos cambios aunque mínimos, podrían indicar que se está llevando a cabo el fenómeno de cavitación y existe producción de radicales libres, pero se puede decir que estos cambios no modificarán la calidad y el sabor de la leche, pues está dentro de los rangos que presenta la leche y estas reacciones son de tipo reversible. Es probable que exista la generación de peróxido de hidrógeno lo cual promueve reacciones de oxidación en las membranas de las células (Findik *et al.*, 2006). Se ha encontrado en estudios realizados específicamente en desinfección de agua, que la producción de radicales hidroxilo (OH<sup>-</sup>), los cuales derivan en la producción de este peróxido hidrógeno, varía con la frecuencia, el tiempo, la amplitud y hasta la presión (Vercet, 1998) un aumento de estos parámetros, elevan la concentración de peróxido de hidrógeno, así a 118 kHz y una hora de tratamiento se produce 2.5 mg/L de agua sonicada (Inoue *et al.*, 2006). Estudios en la leche han demostrado que ha concentraciones de 400 mg/L de este conservador no existen alteraciones en el sabor, caseína, grasa, carbohidratos de la leche mientras que la pérdida de vitaminas es muy poca por lo tanto la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en leche irradiada es mucho menor y puntual en las células de las bacterias lo cual no dañaría la calidad de la leche (INFOPRESSCA, 2006). Aunque estas pequeñas variaciones en el pH también pudieron deberse a cuestiones propias del instrumento de medición.

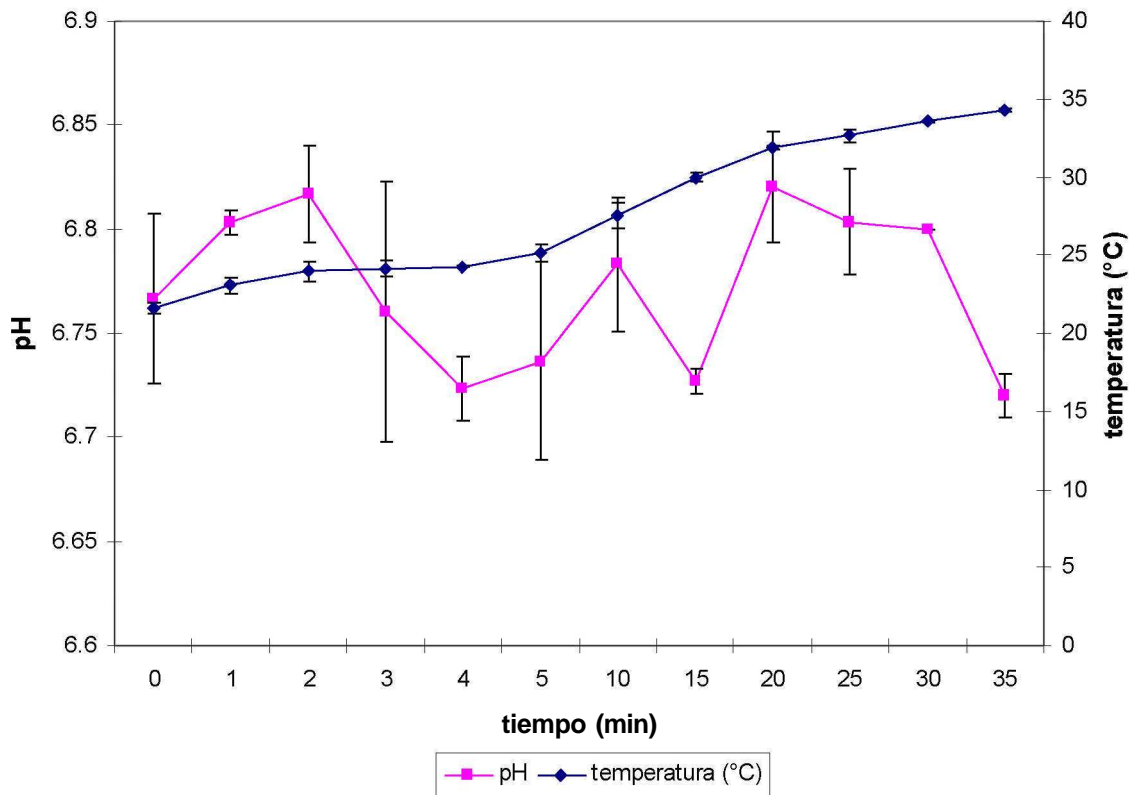


Figura 5.2 Efecto del ultrasonido en el pH y la temperatura en leche por irradiación ultrasónica de 22 MHz por tiempos de 0 a 35 min

### 5.2.1 AJUSTE MATEMÁTICO DEL EFECTO DEL TIEMPO DE IRRADIACIÓN ULTRASÓNICA SOBRE LA TEMPERATURA

Se hizo un ajuste matemático para los datos de temperatura obtenidos como resultado del tratamiento ultrasónico (tabla 5.1) en la leche para encontrar una ecuación empírica que relacione el tiempo de tratamiento contra la temperatura.

Tabla 5.1 Temperatura de la leche después a diferentes tiempos de irradiación ultrasónica a 22 kHz

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
0	21.51
1	23.07
2	23.97
3	24.17
4	24.27
5	25.13
10	27.57
15	30.00
20	31.93
25	32.63
30	33.57
35	34.33

Se aplicaron diversos modelos matemáticos para los datos de tiempo y temperatura el modelo más adecuado fue el modelo logístico (tabla 5.2), con el cual se obtuvo la ecuación 5.6 y se ajustaron los datos experimentales (fig. 5.3)

Tabla 5.2 Modelos ajustables al comportamiento de la temperatura

Modelo	Error estándar (s)	Coefficiente de correlación (r)
Modelo logístico	0.360	0.997
Función racional	0.380	0.997
Modelo Gaussiano	0.412	0.916
Arreglo sinusoidal	0.397	0.997
Modelo MMF	0.412	0.997
Modelo Richards	0.382	0.997
Relación Gompertz	0.362	0.997
Asociación exponencial (3)	0.368	0.997

$$T = \frac{a}{1 + be^{-ct}} \quad (5.6)$$

Donde: a= 35.614106  
b= 0.61229303  
c= 0.078549671

Es decir:

$$T = \frac{35.614106}{1 + 0.61229303e^{-0078549671t}} \quad (5.7)$$

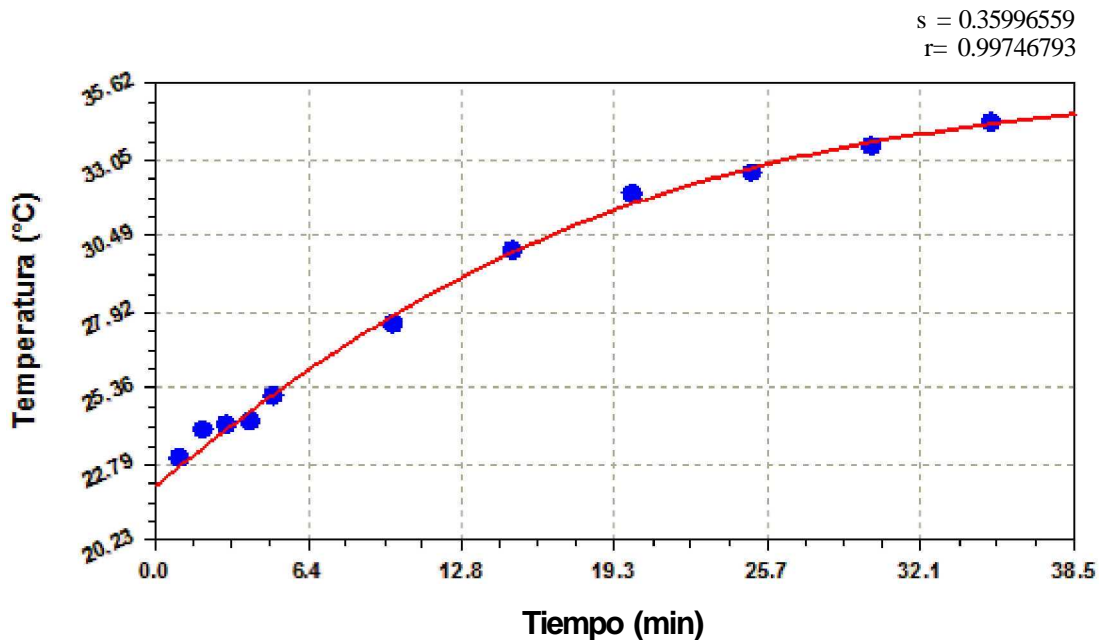


Figura 5.3 Gráfica ajustada de la variación de la temperatura en la leche siguiendo el modelo logístico

### 5.3 CURVA DE CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (figs. 5.4 y 5.5); estableciéndose las fases de crecimiento: latencia, logarítmica, estacionaria y de muerte para ambas cepas.

Estas curvas se obtuvieron para conocer la fase de crecimiento, en donde se tomaría el inóculo para realizar las pruebas en leche. Un parámetro importante de conocer es la velocidad de crecimiento de las cepas ( $u$ ), la cual se calcula a partir de la fase logarítmica o exponencial, a través de la linealización de esta fase y las ecuaciones resultantes fueron:  $y=0.1698x-1.4835$  ( $r^2= 0.9822$ ); y  $y=0.2875x-2.1902$  ( $r^2=0.9395$ ) para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente.

La velocidad de crecimiento es la pendiente de la fase de crecimiento, por lo tanto, la velocidad de crecimiento para el *Escherichia coli* es de  $0.170 \text{ h}^{-1}$  y para *Staphylococcus aureus* de  $0.290 \text{ h}^{-1}$ . El crecimiento de *S. aureus* es más lento,

aproximadamente un 60% más que *E. coli*. La velocidad de crecimiento reportada para *E. coli* es de  $0.40 \text{ h}^{-1}$  en caldo TSB (caldo soya tripticasa) a  $37^\circ\text{C}$  y la de *S. aureus* es de  $1.15 \text{ h}^{-1}$  en caldo BHI (caldo infusión cerebro-corazón) a  $37^\circ\text{C}$  (ICSMF, 1998). Esta diferencia de velocidades ya reportadas coinciden con los datos aquí obtenidos, sin embargo en ambos casos la  $\mu$  fue menor al reportado. La diferencia de las velocidades de crecimiento, reportadas y experimentales, puede deberse al tipo de medio de cultivo pues son diferentes los nutrientes proporcionados a las bacterias lo que modifica el tiempo de crecimiento.

Para inocular la leche, el inóculo se tomaba a las 13 horas de incubación, con el fin de contar con un cultivo en la misma fase y con un número de bacterias similar, y así se realizó durante todo el trabajo de experimentación

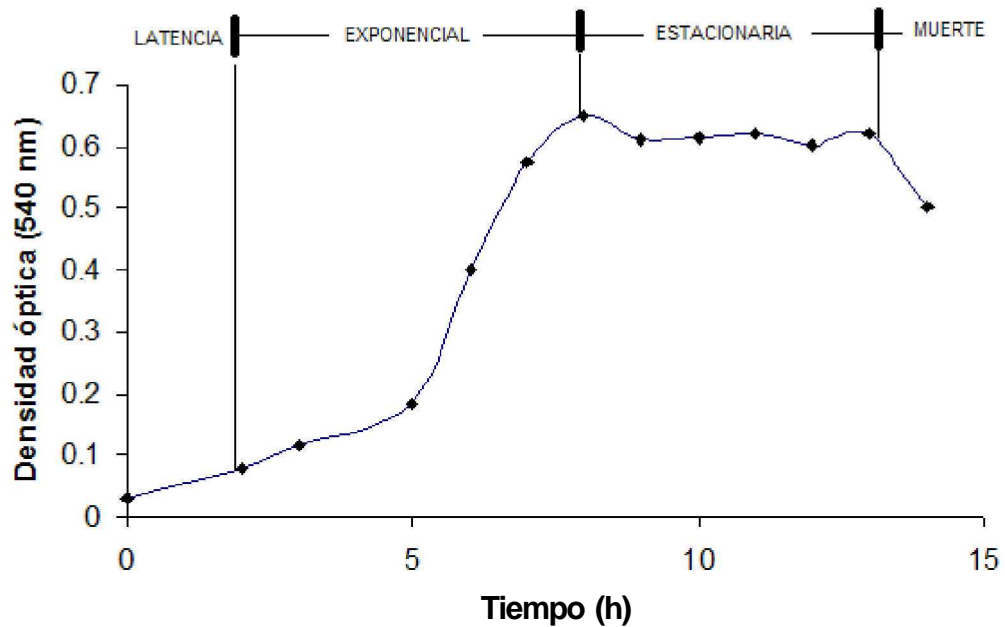


Figura 5.4 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en caldo lactosado biliado verde brillante a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$

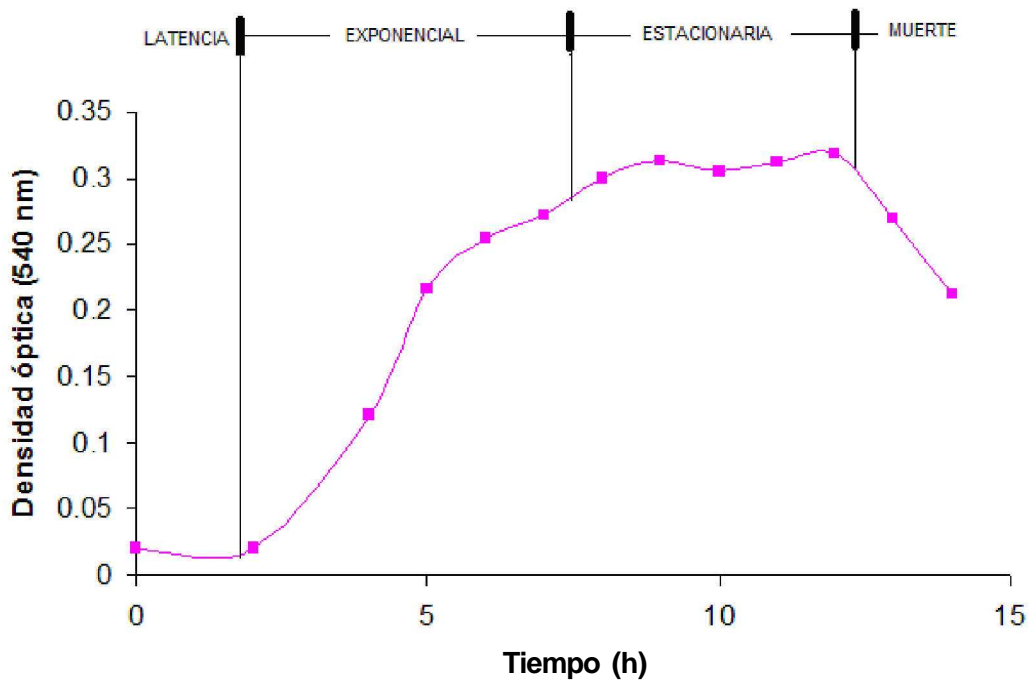


Figura 5.5 Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en caldo nutritivo a 37±1°C

#### 5.4 EFECTO DEL ULTRASONIDO EN LA MUERTE MICROBIANA.

La disminución microbiana debido al ultrasonido aplicado en leche sigue la misma tendencia en los primeros minutos, periodo en el que se presenta la mayor disminución de la población tanto para *Escherichia coli* como *Staphylococcus aureus*. Para *E. coli*, en los primeros 5 minutos de tratamiento la disminución fue de 1.77 ciclos logarítmicos, mientras que para *S. aureus* solo de 0.66 ciclos logarítmicos, es decir, que la letalidad del ultrasonido que causa en la bacteria *E. coli* es 138% más rápida que *S. aureus*. La mayor disminución para *E. coli* se alcanza a los 10 minutos de irradiación ultrasónica y para *S. aureus* se alcanza a los 15 minutos. Posteriormente ya no se observa una disminución de la población microbiana (figs. 5.6 y 5.7). Esto podría explicarse, como lo que sucede con otras técnicas como los rayos ultravioleta, por la existencia de una fracción de la población microbiana que es resistente. Otra posible explicación es que una parte de los sólidos suspendidos de la muestra irradiada por ultrasonido funcionan como un escudo para los microorganismos (Karel y Lund, 2003).



El efecto bactericida del tratamiento ultrasónico que tiene sobre las dos bacterias se ve reflejado en la reducción de la población microbiana. La mayoría de los autores están de acuerdo que la cavitación es responsable de los efectos letales del ultrasonido (Raso *et al.*, 1998a; Villamiel y de Jong, 2000a; Piyasena *et al.*, 2003; Mañas y Pagán, 2005). Una combinación de mecanismos físicos y químicos que ocurren durante la cavitación acústica podrían ser los responsables. El mecanismo químico se debe a las fuerzas mecánicas y a los cambios de presión y temperatura los cuales disocian moléculas de agua en radicales libres H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup>. Estos radicales atacan la estructura química de la bacteria de la célula pues se forma peróxido de hidrógeno el cual es un fuerte bactericida. El mecanismo físico puede ser consecuencia de los microscópicos choques de las ondas produciendo gradientes de presión y temperatura por el colapso de las burbujas de gas causando cortes en las paredes de las células, rupturas y adelgazamiento de las membranas celulares, un stress por un periodo de tiempo dependiendo de la frecuencia y daños en el DNA por la producción de radicales libres (Joyce *et al.*, 2003; Entezari *et al.*, 2004; Ananta *et al.*, 2005; Mañas y Pagán, 2005)

Con la aplicación de este tratamiento se logró reducir el número de bacterias viables de la leche en un 99.62 % para el caso de la bacteria *E. coli* y un 90.66% para *S. aureus*; con un tratamiento térmico como la ultrapasteurización se logra una disminución de 99.9999% o de hasta 12 ciclos logarítmicos. Con el tratamiento de la leche con el método y las condiciones establecidas no llegan a cumplir con una eliminación adecuada o requerida como en el caso de la ultrapasteurización.

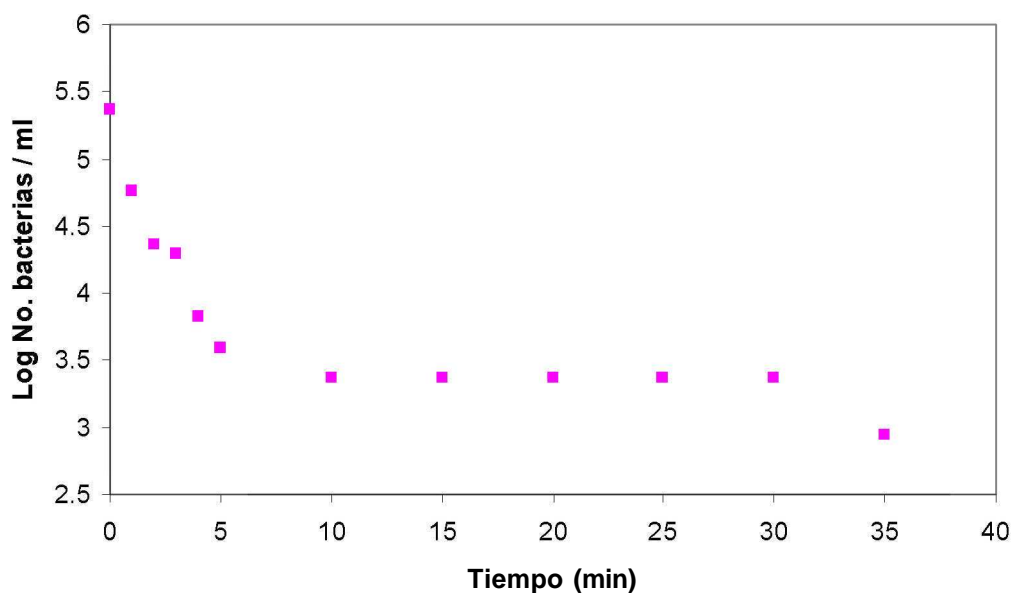


Figura 5.6 Efecto bactericida del ultrasonido sobre *Escherichia coli*

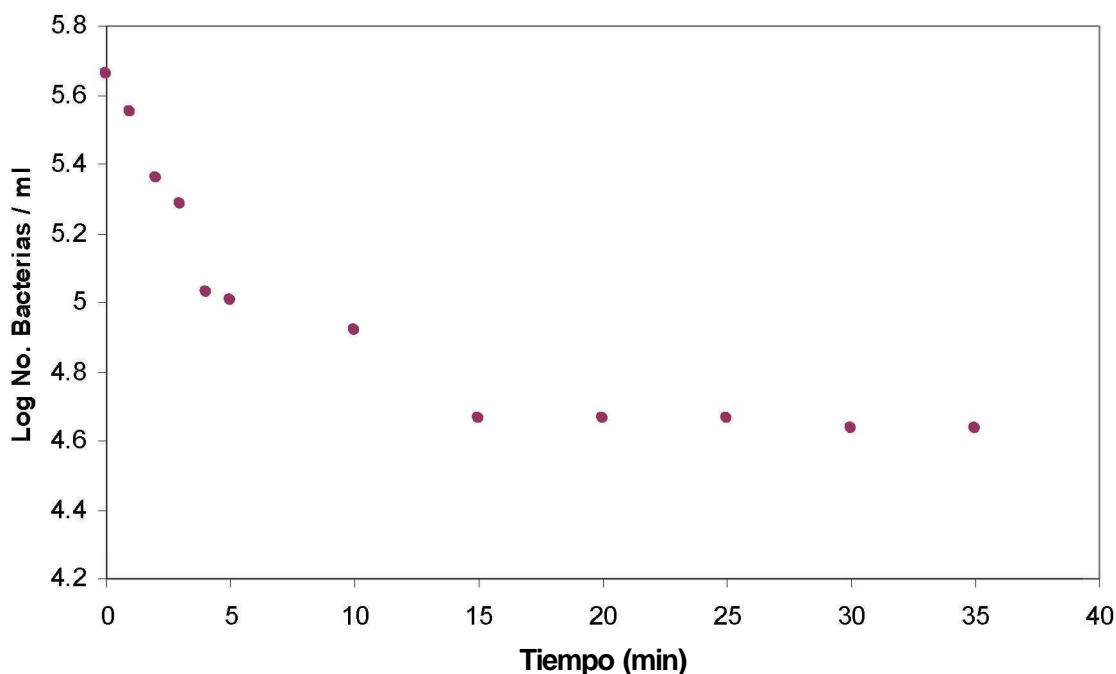


Figura 5.7 Efecto bactericida del ultrasonido sobre *Staphylococcus aureus*

Otros aspectos que pueden afectar la resistencia microbiana son las propiedades del alimento, las características microbianas y los parámetros del proceso. Respecto a las características microbianas las esporas bacterianas son más resistentes que los microorganismos; las bacterias Gram (+) son más flexibles que las bacterias Gram (-) y esto ha sido atribuido a la rigidez de sus paredes celulares (Villamiel y de Jong, 2000a; Mañas y Pagán, 2005) tal como sucedió con *E. coli* que resultó ser más resistente que *S. aureus*. Otro de los factores que afectan la resistencia bacteriana son la composición del medio, pH: a menor pH como es el caso en jugos donde existe un mayor efecto benéfico del ultrasonido (Kuldiloke, 2002), actividad de agua: a mayor actividad de agua mayor efecto benéfico del ultrasonido (Álvarez *et al.*, 2003; Álvarez *et al.*, 2006) y la adición de agentes antimicrobianos: benzoato de sodio y potasio de sodio reducen el tiempo de tratamiento ultrasónico (Arce-García *et al.*, 2002) o el uso de ácido peroxiacético en semillas de alfalfa (Scouten y Beuchat, 2002). Sin embargo estos parámetros no se pueden modificar en la leche el pH es neutro y los agentes microbianos están muy limitados en el uso de productos lácteos sobretodo en leche por norma oficial mexicana 091 (NOM 091, 1994).

Otros parámetros críticos son el tiempo de ultrasonido: a mayor tiempo de exposición de la muestra mayor muerte microbiana como lo muestran las figuras 5.6 y 5.7, antes de alcanzar el periodo constante, la población microbiana podría disminuir a un más aunque no sería viable mayor tiempo de tratamiento pues en

comparación con la pasteurización lenta que se realiza en 30 minutos sería en procesos industriales sería económicamente inviable. La amplitud de las ondas es otro factor que influye: a mayor amplitud menor número de microorganismos sobrevivientes al tratamiento (Raso *et al.*, 1998a) la amplitud esta relacionada con la potencia al aumentarla es necesario tener en cuenta el gasto de energía eléctrica pues se busca una tecnología amigable con el ambiente. La presión hidrostática: a mayores presiones mayor letalidad (Raso *et al.*, 1998b) y temperatura. Un parámetro registrado muy poco es la frecuencia si más ondas se mandan por segundo mayor puede ser la letalidad para los microorganismos como lo registraron Joyce *et al.*, (2003) al usar frecuencias de 850 kHz y compararlas con 38 kHz siendo las primeras notablemente más dañinas.

## 5.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO TERMOULTRASÓNICO EN LA MUERTE MICROBIANA.

Al no haber obtenido una muerte total de microorganismos en el tratamiento ultrasónico a temperatura ambiente, se procedió a combinarlo con temperaturas mayores, de 40, 50 y 60°C, buscando un incremento en el efecto bactericida del ultrasonido. La elección de estas temperaturas se hizo en base a la pasteurización lenta de 62°C, debido a que a esta temperatura no se observan cambios drásticos en las propiedades de la leche y buscando no manejar altas temperatura para evitar el gasto de energía, lo que implica el ahorro de combustibles fósiles y favorecer al medio ambiente y los costos.

La irradiación ultrasónica fue combinada con las tres temperaturas: 40, 50 y 60°C en el tratamiento de muestras de leche. Para el caso de la leche inoculada con *Escherichia coli* a la temperatura de 40°C, a los 35 minutos de tratamiento, solo se logró disminuir un 99.97%. A 50°C se alcanzó la muerte microbiana a los 10 minutos de tratamiento y a 60°C se obtuvo la muerte microbiana a los 5 minutos (tabla 5.3). No hay diferencia significativa ( $\alpha < 0.01$ ) entre ambas temperaturas, sin embargo en un proceso industrial tendría que evaluarse si resulta más conveniente calentar la leche a 60°C e irradiarla por 5 min o solamente calentarla a 50°C pero extender el doble de tiempo de irradiación ultrasónica, evaluando tiempos y precios de combustible.

Para *Staphylococcus aureus* el efecto de la temperatura fue distinta, La muerte microbiana total se logró únicamente a 60°C con 15 minutos de tratamiento ultrasónico a 40°C después de 35 minutos solo se alcanzó una disminución del 99.91% y a 50°C del 99.98% (tabla 5.4).

Tabla 5.3 Efecto de la sonicación y la temperatura en la muerte de *Escherichia coli*

Tiempo de tratamiento (min)	Log No. Bacterias de <i>E. coli</i> (Log no. Bacterias/mL)		
	40°C	50°C	60°C
0	5.362	5.362	5.362
1	4.176	3.487	3.041
2	3.663	3.041	2.828
3	3.204	2.552	1.663
4	3.114	2.380	1.362
5	2.663	1.663	0
10	2.487	0	0

Tabla 5.4 Efecto de la sonicación y la temperatura en la muerte de *Staphylococcus aureus*

Tiempo de Tratamiento (min)	Log No. Bacterias de <i>S. aureus</i> (Log No. Bacterias/mL)		
	40°C	50°C	60°C
0	5.663	5.663	5.663
1	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND
3	4.663	4.591	ND
4	ND	ND	ND
5	4.247	4.176	4.322
10	3.663	3.079	2.830
12	ND	ND	2.009
13	ND	ND	1.362
14	ND	ND	0.845
15	3.355	2.875	0

\*ND: No Determinado

El calor causa daños a la membrana, pérdida de iones y nutrientes, agregación ribosomal, rompimiento de las cadenas de DNA, inactivación de enzimas esenciales, coagulación de proteínas. En otras palabras, casi toda la estructura celular es afectada de alguna manera afectadas a elevadas temperaturas y es muy difícil distinguir cuales son los factores que dejan a la célula muerta (Gould, 1989). Para la termoultrasonificación se ha sugerido que elevar la temperatura (50-

60°C) causaría un debilitamiento en las membranas celulares, facilitando la destrucción mecánica de la célula por las ondas ultrasónicas (Álvarez, 2003).

Además la temperatura del líquido que se somete a sonicación tiene una gran influencia sobre la intensidad de la cavitación. La temperatura modifica varias propiedades del sistema líquido, como son: la viscosidad, la tensión superficial y principalmente la presión de vapor. La viscosidad disminuye cuando se incrementa la temperatura por lo tanto el ultrasonido tiene mayor penetración (Villamiel y de Jong, 2000b), por esta razón también cambia la propiedad de atenuación directamente relacionada con la viscosidad y las ondas acústicas ya no se atenúan tan fácilmente. Al aumentar la temperatura disminuye la tensión superficial pues disminuyen las fuerzas de cohesión intermolecular y las ondas ultrasónicas se transportarían más rápidamente y sin obstáculos por el líquido. Además cuando la temperatura del líquido se incrementa, las burbujas llegan a ser más numerosas entonces la cavitación es más intensa.

Por otra parte, como la temperatura del líquido se incrementa el líquido tiene una presión de vapor más alta y el contenido de gas dentro de las burbujas es mayor por lo que la fuerza de implosión del colapso de la cavitación decrementa. Esas dos tendencias opuestas sugieren que hay una temperatura óptima en la cual la cavitación es más intensa (Niemczewski, 2006). Esta doble tendencia en la minimización de la implosión de las burbujas, en el caso de la leche, la concentración de sólidos en suspensión podría jugar un importante papel y mejorar la intensidad de la cavitación, aunque el mecanismo no es claro pues se necesitan más estudios para comprender esta influencia (Villamiel y de Jong, 2000a).

Las curvas de sobrevivencia de cada uno de los microorganismos probados (figs. 5.8 y 5.9) presenta un ajuste lineal. Para el caso del tratamiento a 23°C solo se incluyeron los datos donde hay muerte y sigue el comportamiento de una línea recta, cada curva de sobrevivencia viene determinada por la temperatura de tratamiento en las dos bacterias, de tal forma que si la temperatura es distinta, la pendiente de la recta también lo será. Si la temperatura aumenta la pendiente es más inclinada, exceptuando en *S. aureus* a 23 y 40°C donde es mínima la diferencia.

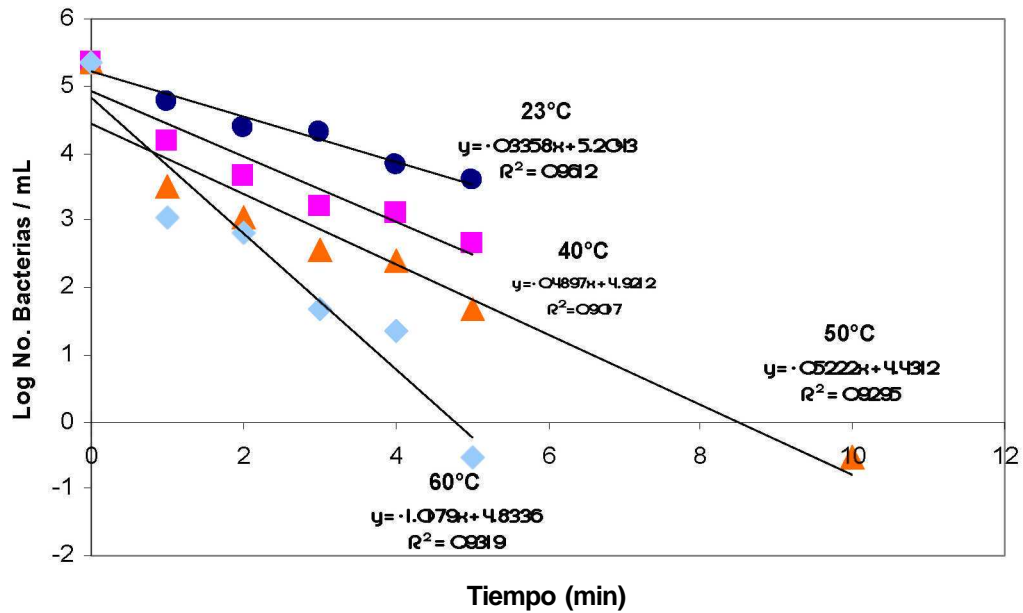


Figura 5.8 Curva de sobrevivencia de *E. coli* a diferentes temperaturas.

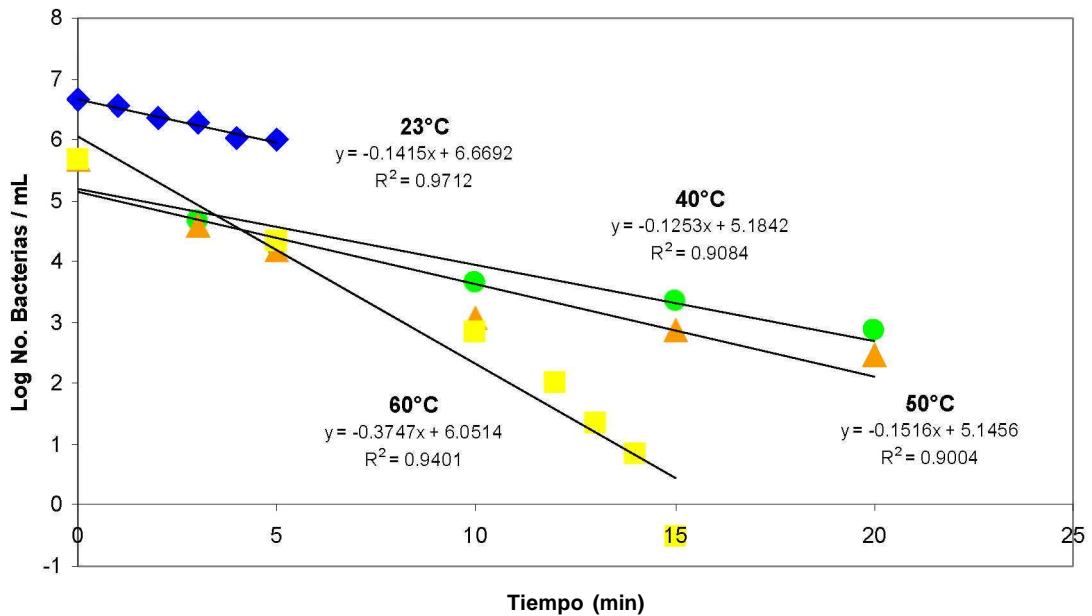


Figura 5.9 Curva de sobrevivencia de *S. aureus* a diferentes temperaturas

La velocidad de destrucción de un microorganismo regularmente sigue una cinética de primer orden. Así, si  $N$  es el número de microorganismos, su variación con el tiempo se expresa como:

$$\frac{\partial N}{\partial t} = -kN \quad (5.8)$$

La ecuación 5.8 que puede integrarse con la condición límite que para el tiempo inicial existen  $N_0$  microorganismos, obteniéndose:

$$N_x = N_0 \exp(-kt) \quad (5.9)$$

Si se realiza el análisis matemático de la ecuación (5.8) se tiene:

$$\int_{N_0}^N \frac{\partial N}{N} = \int_{T=0}^t -k \partial t \quad (5.10)$$

Integrando:

$$\ln N = -kt + \ln N_0 \quad (5.11)$$

Reordenando:

$$\ln \frac{N}{N_0} = -kt \quad (5.12)$$

Como:

$$\ln N = 2.3 \log N \quad (5.13)$$

Entonces:

$$\log N = -\frac{k}{2.3}t + \log N_0 \quad (5.14)$$

En una representación esquemática:





$$k = \frac{2.3}{D} \quad (5.19)$$

Donde:

$D$ = tiempo de reducción decimal

$k$ =Constante de proporcionalidad

$t$ = tiempo

El tiempo de reducción decimal (valor  $D$ ) fue determinado de la regresión lineal de las ecuaciones. Se define el valor  $D$  como el tiempo necesario para que el número de sobrevivientes caiga al 10% del valor inicial (o para que el logaritmo del número de sobrevivientes se reduzca una unidad). Se considera  $N_0$  como el número de células al inicio del tratamiento y  $N_x$  el número de células sobrevivientes después del tratamiento ultrasónico al tiempo de tratamiento. El valor  $D$  también se calcula de la siguiente manera:

$$Dt = \frac{x}{\log(N_0/N_x)} \quad (5.20)$$

Durante el tratamiento ultrasónico *E. coli*, (Gram -), mostró mayor resistencia a la destrucción en comparación con *S. aureus*, (Gram +) (tabla 5.5). El valor  $D_{s-23^\circ\text{C}}$  para *S. aureus* fue dos veces más alto que el valor  $D$  para *E. coli* (7.067 y 2.977 min respectivamente). Para las diferentes temperaturas los valores siguen siendo más altos para el microorganismo Gram (-) siendo hasta tres veces y medio más alta a temperaturas de  $60^\circ\text{C}$ . Otros estudios reportados también muestran una susceptibilidad mayor para *E. coli* hacia el ultrasonido comparados con *S. aureus* (Villamiel y de Jong, 2000a; Ananta *et al.*, 2005).

Tabla 5.5 Efecto de la termosonicación en el tiempo de reducción decimal (valor  $D$ )

Bacteria	Temperatura De Sonicación ( $^\circ\text{C}$ )	Valor $D_{s-T^\circ\text{C}}$ (min)
<i>E. coli</i>	23	2.977
	40	2.042
	50	1.914
	60	0.999
<i>S. aureus</i>	23	7.067
	40	7.174
	50	6.596
	60	2.668

Este fenómeno puede ser atribuido a que las bacterias Gram (+) son menos sensibles al ultrasonido porque tienen una capa más gruesa e impermeable de peptidoglicanos que las bacterias Gram (-). Es muy probable que el punto de ataque del ultrasonido sea dañar el interior de la membrana citoplasmática que consiste de una bicapa de lipoproteínas aunque la naturaleza exacta del daño a la membrana interna no es bien conocida de acuerdo con lo reportado por Scherba *et al.*, (1991) y Ananta *et al.*, (2005) en sus estudios.

El tiempo de destrucción termoultrasónica varía para cada microorganismo y también para cada temperatura de forma que a mayores temperaturas el valor D es menor. Si se aumenta la temperatura, el tiempo para descender un ciclo logarítmico decrece. En el caso de *E. coli* la temperatura óptima son 60°C y 5 minutos de tratamiento ultrasónico pues disminuye la población microbiana a <0.3 bacterias/mL según método NMP. Para *S. aureus* también se observa una disminución, sin embargo para las temperaturas de 23 y 40°C la diferencia en el valor D es mínima puede deberse a un error experimental no existe diferencia significativa ( $\alpha < 0.01$ ), por su puesto la mejor temperatura también son 60°C pero el tratamiento necesario son 15 minutos y así alcanzar una disminución de bacterias de < 0.3/mL según la técnica del NMP, Debe resaltarse que esto se comprobó mediante el crecimiento en caja de Petri y no creció ninguna colonia.

Cuando los valores D son graficados contra las correspondientes temperaturas, el recíproco de la pendiente es igual al valor Z, este valor se define como el incremento en temperatura que se requiere para decrementar en 1 ciclo logarítmico el valor D (Smit, 2000). La relación también puede ser relacionada con la temperatura por la ecuación de Arrhenius, esta ecuación se emplea para relacionar la dependencia de la temperatura:

$$k = k_0 e^{(-Ea/RT)} \quad (5.21)$$

También puede representarse como:

$$\log \frac{k_1}{k_2} = \frac{Ea}{2.3R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (5.22)$$

Si se muestra esquemáticamente:

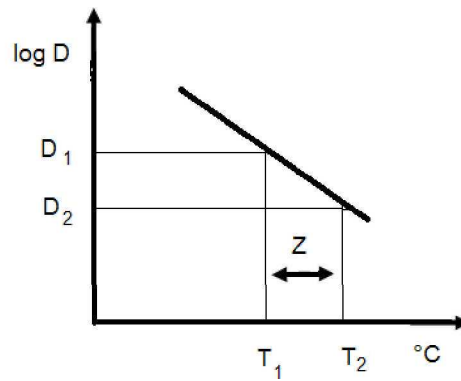


Figura 5.11 Gráfico de termodestrucción

De la figura 6.12:

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{T_1 - T_2}{Z} \quad (5.23)$$

y

$$\log \frac{k_1}{k_2} = \log \frac{D_2}{D_1} \quad (5.24)$$

Entonces:

$$\log \frac{D_2}{D_1} = \frac{Ea}{2.3R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (5.25)$$

Arreglando la ecuación 6.22:

$$\frac{T_2 - T_1}{Z} = \frac{Ea}{2.3R} \left( \frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (5.26)$$

Por lo tanto:

$$\frac{T_2 T_1}{Z} = \frac{Ea}{2.3R} \quad (5.27)$$

Donde:

Z= Temperatura de muerte térmica

T= Temperatura

Ea= Energía de activación

R= Constante de los gases

Con ayuda de las ecuaciones 5.21 a 5.27 se obtuvieron los valores de Z, k y Energía de activación para el ultrasonido y de esta manera se compararon con los valores de tratamientos térmicos encontrados en la bibliografía

La constante *k* o constante de proporcionalidad indica la velocidad con que mueren los microorganismos. A mayor temperatura la velocidad de muerte es mayor. Los resultados demuestran que muere más rápido el Gram (-) que el Gram (+). La comparación más viable es con *S. aureus* ya que se tiene a la misma temperatura y la velocidad de reacción es más alta en tratamientos térmicos. El valor Z es reportado como un promedio en los tratamientos térmicos y así se reportó para la termoultrasonificación, este valor representa para tratamientos térmicos un 20% de lo que es para la termoultrasonificación (tabla 5.6). El valor Z refleja la dependencia de la reacción a la temperatura. Las reacciones con un valor bajo de Z son altamente dependientes de la temperatura mientras que los valores altos de Z necesitan cambios más grandes en la temperatura para reducir el tiempo. Como muestra la ecuación 6.24, Z es inversamente proporcional a la energía de activación; a valores bajos de Z se tendrá valores altos de energía de activación y a valores altos de Z la energía de activación será menor. Por lo tanto, los tratamientos térmicos brindan una mayor energía de activación.

Tabla 5.6 Comparación del valor k, valor Z y energía de activación entre la termoultrasonificación y tratamientos térmicos

Microorganismo	TERMOULTRASONIFICACIÓN			TRATAMIENTOS TÉRMICOS		
	K (min <sup>-1</sup> )	Z (°C)	Ea (kJ/mol)	k (min <sup>-1</sup> )	Z (°C)	Ea (kJ/mol)
<i>E. coli</i>	0.772 (23°C) 1.126 (40°C) 1.201 (50°C) 2.302 (60°C)	30	58.080	1.110 (57.2°C)	7	ND
				0.385 (55°C)		
<i>S. aureus</i>	0.325 (23°C) 0.320 (40°C) 0.328 (50°C) 0.862 (60°C)		80.800	0.921 (60°C)		224.000

\*ND: No Determinado

FUENTE: FDA, 2000 (tratamientos térmicos)

## 5.6 EFECTO DE LA TERMOULTRASONIFICACIÓN EN LA CALIDAD MICROBIANA DE LA LECHE BRONCA

La prueba de azul de metileno o reductasa es una de las pruebas rápidas que se le realizan a la leche cuando llega a la industria láctea para evaluar la calidad microbiológica, organoléptica y fisicoquímica, con la finalidad de aceptarla o no. Estas pruebas rápidas son conocidas como pruebas de andén. La prueba de azul de metileno está basada en el potencial óxido-reducción que tienen los microorganismos, así al añadir cierta cantidad de azul de metileno, las enzimas producidas por los microorganismo de la leche decoloran el azul de metileno. Entre mayor carga microbiana tenga la leche se llevará a cabo más rápido la decoloración. No todas las especies microbianas tienen el mismo poder reductor. Las bacterias proteolíticas tienen un bajo o casi nulo poder de reducción mientras que las bacterias lácticas o colibacterias son fuertemente reductoras. Esta prueba sirve para determinar la calidad de leche y determinar el número de

microorganismos presentes en ella (tabla 5.7). El objetivo de realizar esta prueba, es para tener una aproximación del efecto de la termoultrasonificación sobre la carga microbiana total de la leche y complementar la cuenta bacteriana.

Tabla 5.7 Determinación del número de microorganismos en leche según la prueba de azul de metileno

Tiempo de Reducción	Número de microorganismos/mL	Clase de leche
Menos de 20 min	Más de 20 millones	Muy mala
De 20 a 120min	De 20 a 3 millones	Mediana a regular
De 120 a 420 min	De 3 millones a 100000	Buena
Más de 420 min	Menos de 100000	Muy buena

FUENTE: Dobler, 2000

El tiempo que tardó en decolorarse la leche bronca en los diferentes tiempos de tratamiento termoultrasonico varió de 111 a 600 min, el mejor tratamiento con ultrasonido fue a 60 °C 35 min, (tabla 5.8). La leche bronca presentó una carga microbiana de 20 a 3 millones de microorganismos/mL y después de cualquier tratamiento ultrasonico con calor mejoró la clase de la leche y disminuyó la cantidad de microorganismos encontrándose en el rango de 3 millones a 100000 microorganismos/mL. El mejor tratamiento con ultrasonido, (35 min a 60°C) presenta resultados muy similares a la pasteurización rápida, sin embargo el tiempo es casi 50 % menor al requerido por la leche tratada por UHT,

El tratamiento de 15 minutos a 60°C presenta una calidad similar a la de una leche comercial, que en refrigeración tiene una vida útil de una semana, sin embargo no tiene el inconveniente de dañar la estructura de los componentes y la aparición de sabores extraños que tiene una leche pasteurizada a 72°C.

Tabla 5.8 Prueba de azul de metileno aplicada a leche bronca termoultrasonificada

Tipo de tratamiento Ultrasónico	Tiempo de reducción (min)	Clase de leche
Leche Bronca	111	Regular
Leche 23°C 35 min	143	Buena
Leche 40°C 15 min	149	Buena
Leche 40°C 35 min	154	Buena
Leche 50°C 15 min	202	Buena
Leche 50°C 35 min	221	Buena
Leche 60°C 15 min	304	Buena
Leche 60°C 35 min	320	Buena
Leche past rápida	335	Buena
Leche UHT	600	Muy buena

## 5.7 EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LA VISCOSIDAD Y LA DENSIDAD DE LA LECHE BRONCA

La viscosidad es una propiedad importante de la leche, brinda información sobre su estructura y sirve para controlar los procesos de elaboración de productos, para el diseño de máquinas y sobretodo para el control de la calidad ya que la textura del producto es importante para el consumidor. La viscosidad es la resistencia a fluir de un líquido y el método más sencillo para determinarla en un fluido de baja viscosidad es mediante un viscosímetro de Ostwald. La viscosidad de la leche se determina midiendo el tiempo en que tarda en fluir por influencia de la gravedad y se calcula mediante la siguiente ecuación

$$\frac{\eta_L}{\eta_{\text{Agua}}} = \frac{\rho_L \theta_L}{\rho_{\text{Agua}} \theta_{\text{Agua}}}, \quad (5.28)$$

Donde:  $\eta_{\text{Agua}}$  es la viscosidad del agua a 23°C (0.9325 cp);  $\rho_{\text{Agua}}$  es la densidad del agua a 23°C (997.54 kg/m<sup>3</sup>);  $\theta_{\text{Agua}}$  es el tiempo que tarda en fluir el agua (37 s);  $\rho_L$  es la densidad de la leche en el tiempo tratado;  $\theta_L$  es el tiempo que tarda en fluir la leche y  $\eta_L$  es la viscosidad de la leche buscada.

Después de 1 minuto de irradiación ultrasónica de la leche bronca, la viscosidad incrementó 2.6%; al minuto 2 aumenta un 5%, mayor tiempo de tratamiento no logra aumentar más esta propiedad (tabla 5.9).

Tabla 5.9 Resultados de la densidad y viscosidad en leche irradiada por ultrasonido

Muestra irradiada a diferentes tiempos (min)	Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	Tiempo de Flujo (s)	Viscosidad Leche (cp)
0	1023.44	57.00	1.4738
1	1021.66	58.60	1.5126
2	1021.65	60.02	1.5492
3	1021.61	60.02	1.5492
4	1021.07	60.02	1.5483
5	1020.72	60.02	1.5478
10	1020.37	60.02	1.5473
15	1020.36	60.03	1.5475
20	1020.30	60.06	1.5482
25	1019.99	60.07	1.5480
30	1019.59	60.09	1.5479
35	1018.22	60.13	1.5469

El aumento de la viscosidad durante el tratamiento ultrasónica puede deberse a dos fenómenos: a la reducción del tamaño del glóbulo de grasa o a la desnaturalización de las proteínas.

Respecto a la reducción del tamaño de glóbulo de grasa es un efecto benéfico a la leche ya que industrialmente se realiza la operación unitaria llamada homogenización, operación necesaria en el procesamiento de leche para disminuir el tamaño de los glóbulos de grasa y convertir a la leche en una emulsión estable. La homogenización es una operación mecánica la cual consiste en pasar la leche a través de una bomba de alta presión complementada con una abertura muy pequeña de la cual sale la leche con alta presión ocasionando el rompimiento de los glóbulos de grasa. Se ha registrado que por efecto de la homogenización aumenta la viscosidad hasta en un 15% como máximo. El tratamiento ultrasónico aumentó la viscosidad lo que puede indicar que se están reduciendo los glóbulos de grasa de la leche y esto se le puede atribuir a los cambios de presión que provocan la cavitación en el sistema y así causar el rompimiento de la grasa, como el principio en el que está basada la homogenización, cambios de presión.



Otro fenómeno que podría estar ocurriendo es la desnaturalización de las proteínas de la leche ya que se ha investigado que esta modificación aumenta la viscosidad de la leche. El incremento de la viscosidad parece indicar que la proteína pierde su estructura propia, con lo que crece su asimetría; así los grupos hidrófobos antes orientados al interior, originan un descenso de la solubilidad. La desnaturalización implica alteraciones en las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias de las proteínas, excepto la rotura de enlaces covalentes. De hecho, se produce rotura de puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas y enlaces salinos, todo lo cual hace que la molécula se despliegue. En algunas ocasiones, la proteína pierde totalmente su estructura y adquiere una disposición de enrollamiento al azar (Zavala, 2005).

La densidad de una sustancia es igual a la masa de la sustancia dividida entre el volumen que ocupa. En el presente estudio, la densidad de la leche se ve disminuida conforme aumenta el tiempo de tratamiento ultrasónico y la disminución máxima se alcanza a los 35 minutos disminuyendo en un 0.5%. Como se explicó en la viscosidad si se lleva a cabo una reducción de glóbulos de grasa aumentaría la cantidad de éstos y por tanto el volumen lo que cambiaría la densidad.

### 5.7.1 AJUSTE MATEMÁTICO DEL EFECTO DEL TIEMPO DE LA IRRADIACIÓN ULTRASÓNICA EN LA DENSIDAD DE LA LECHE

Se hizo un ajuste matemático para los datos de densidad obtenidos después del tratamiento ultrasónico (tabla 5.9) en la leche para encontrar una ecuación empírica que relacione el tiempo de tratamiento contra la densidad.

Fueron varios los modelos evaluados (tabla 5.10), pero el modelo más adecuado fue el arreglo polinomial (fig. 5.12) dando como resultado la ecuación 5.29).

Tabla 5.10 Modelos ajustables al comportamiento de la densidad

Modelo	Error estándar (s)	Coefficiente de correlación (r)
Arreglo polinomial de 3er orden	0.00038	0.9679
Función racional	0.00041	0.9610
Modelo Harris	0.00043	0.9530
Modelo MMF	0.00047	0.9507

$$Y = a + bx + cx^2 + dx^3 \quad (5.29)$$

Donde

$$\begin{aligned} a &= 1.0226996 \\ b &= -0.00048110159 \\ c &= 2.8437644e-005 \\ d &= -5.2631631e-007 \end{aligned}$$

Es decir:

$$p = 1.0226996 - 0.00048110159t + 0.000028437644t^2 - 0.00000052631631t^3 \quad (5.30)$$

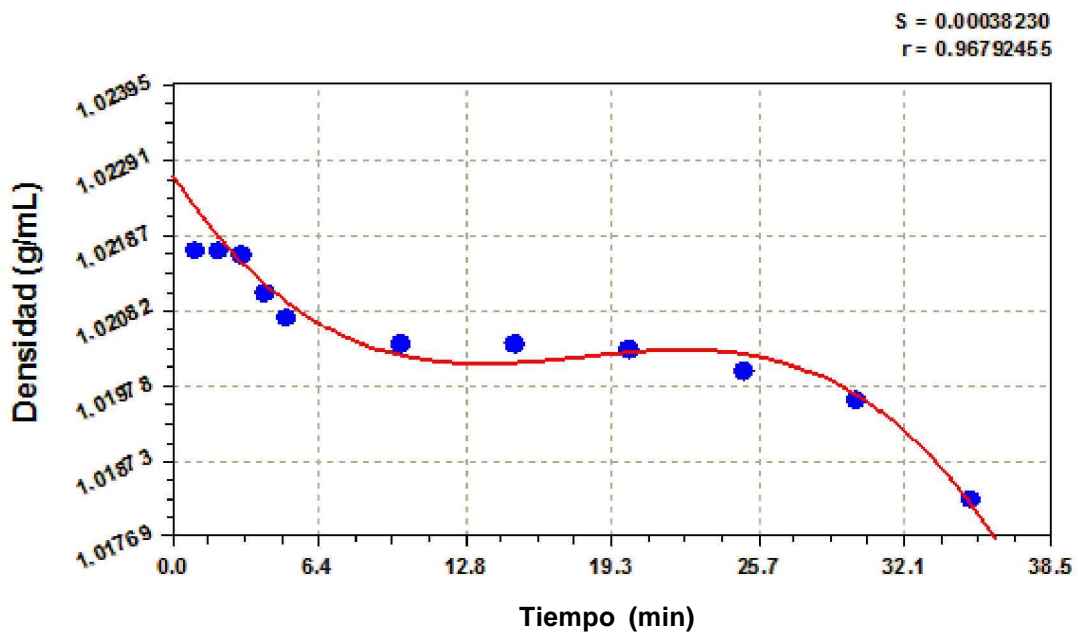


Figura 5.12 Gráfica ajustada de la variación de la densidad por el modelo de arreglo polinomial

### 5.7.2 AJUSTE MATEMÁTICO DEL EFECTO DEL TIEMPO LA IRRADIACIÓN ULTRASÓNICA EN LA VISCOSIDAD DE LA LECHE

Se hizo un ajuste matemático para los datos de viscosidad obtenidos después del tratamiento ultrasónico (tabla 5.9) en la leche para encontrar una ecuación empírica que relacione el tiempo de tratamiento contra la densidad

Fueron varios los modelos evaluados (tabla 5.11) pero el modelo más adecuado fue el modelo MMF (fig. 5.11) dando como resultado la ecuación 5.31.

Tabla 5.11 Modelos ajustables al comportamiento de la viscosidad

Modelo	Error estándar (s)	Coefficiente de correlación (r)
Asociación exponencial (3)	0.0049	0.9806
Función racional	0.0066	0.9690
Modelo Harris	0.0096	0.9241
Modelo logístico	0.0047	0.9821
Modelo MMF	0.0008	0.9995
Relación Gompertz	0.0047	0.9819

$$Y = \frac{ab + cx^d}{b + x^d} \quad (5.31)$$

Donde:

$$\begin{aligned} a &= 1.4738 \\ b &= 10.90962257 \\ c &= 1.5478933 \\ d &= 55.114479 \end{aligned}$$

Es decir:

$$\eta = \frac{1.34060174 + 1.5478933t^{55.114479}}{0.90962257 + t^{55.114479}} \quad (5.32)$$

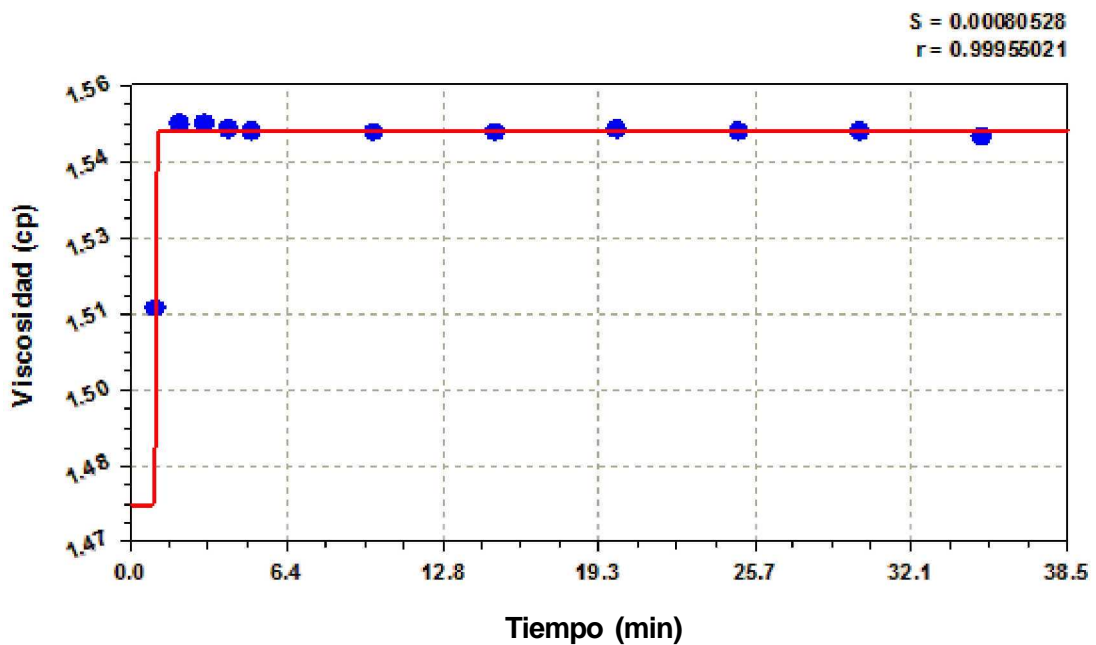


Figura 5.13 Gráfica ajustada de la variación de la viscosidad por el modelo MMF

Los análisis estadísticos correspondientes a la viscosidad y densidad pueden ser consultados en el Anexo A.

## 5.8 EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE EL TAMAÑO DE LOS GLÓBULOS DE GRASA DE LA LECHE BRONCA

Para saber si el ultrasonido estaba reduciendo el tamaño de los glóbulos de grasa, se midió el tamaño de los mismos después de los diferentes tiempos de tratamiento ultrasónico (fig. 5.14).

La leche bronca mostró tamaños de glóbulos de grasa de hasta 21.2  $\mu\text{m}$  con la aplicación del ultrasonido se ven reducidas de tamaño hasta en un 58% en los primeros 25 minutos de tratamiento. Sin embargo, no se logró demostrar una tendencia de la reducción del tamaño respecto al tiempo de tratamiento, esto pudo deberse a que no se realizaron suficientes mediciones para comprobar la tendencia. Después de 30 min de irradiación ultrasónica el tamaño de los glóbulos de grasa es menor a 0.89  $\mu\text{m}$  y ya no fueron observables con el microscopio a un aumento de 100x, lo cual indica que se rompieron los glóbulos de grasa y se confirma al compararlos cualitativamente con la leche comercial, pues en la leche UHT tampoco fue posible medir las partículas de grasa (tabla 5.12).

Tabla 5.12 Disminución del glóbulo de grasa obtenido del tratamiento ultrasónico

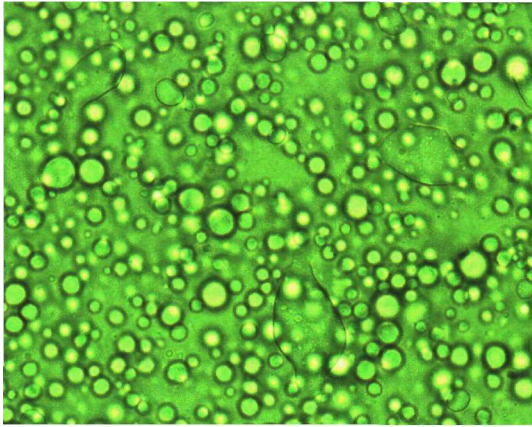
TIEMPO DE TRATAMIENTO (min)	PROMEDIO $\mu\text{m}$	MÍNIMO $\mu\text{m}$	MÁXIMO $\mu\text{m}$	DESV EST
0	7.11	2.07	21.2	7.11
1	1.77	1.59	6.23	1.63
2	1.48	1.22	3.60	0.79
3	1.80	1.77	4.44	0.76
4	2.66	1.51	7.12	1.19
5	3.56	1.87	6.64	1.15
10	2.58	1.59	3.30	0.45
15	2.07	1.18	2.96	0.52
20	2.46	1.48	3.84	0.60
25	1.49	0.89	2.97	0.54
30	ND	ND	ND	ND
35	ND	ND	ND	ND
Comercial UHT	ND	ND	ND	ND

\* ND: No Detectado a 100x de aumento

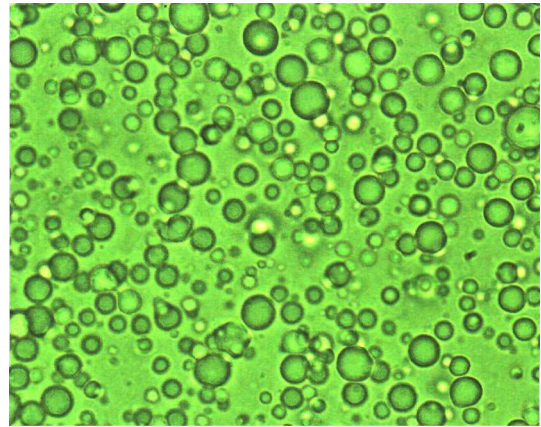
El efecto del ultrasonido sobre la disminución del tamaño de glóbulo de grasa de la leche ha sido atribuido al fenómeno de cavitación. Durante el tratamiento ultrasónico, las principales fuerzas que se forman son de naturaleza mecánica, resultando en la formación e implosión de burbujas en el líquido (Ertugay *et al.*, 2002). Puede suponerse que los diferentes cambios de presión que se forman son los responsables de la homogenización. Ésto guarda el mismo principio que la homogenización convencional, pues como ya se ha mencionado el efecto homogenizador consiste en hacer pasar la leche a elevada presión a través de estrechas hendiduras cuyas medidas son menores que las de los glóbulos grasos de 10 a 35 MPa.

Es necesario comparar la homogenización convencional con la reducción de glóbulos de grasa efecto de la aplicación del ultrasonido. Dentro de la industria láctea se considera una homogenización satisfactoria si el 85% de los glóbulos de grasa miden menos de 1  $\mu\text{m}$  y si después de 48 horas de estar en reposo la leche no ocurre ninguna separación visible entre la leche y la porción de grasa de la misma (Revilla, 1983 y Spreer, 1991). Al comparar con el efecto del ultrasonido en los glóbulos grasos no se observó separación de la materia grasa, además el tamaño de los glóbulos de grasa era menor a 0.89  $\mu\text{m}$ , es decir, se obtuvo como resultado una leche y también más viscosa como ya se comprobó debido a un mayor número de partículas de grasa, por lo tanto también se comprueba que la viscosidad aumenta por la reducción de los glóbulos de grasa.

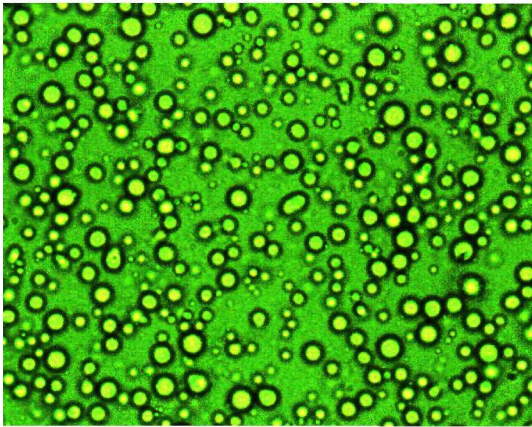




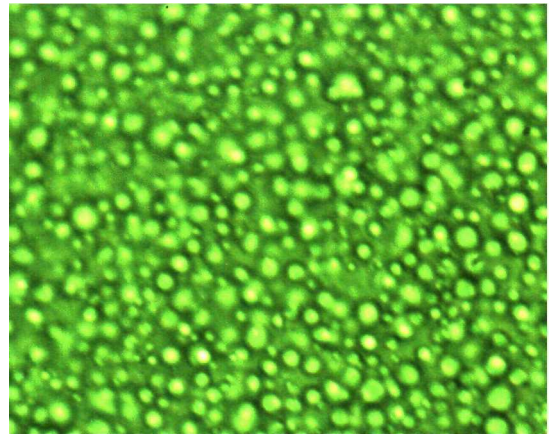
(A)



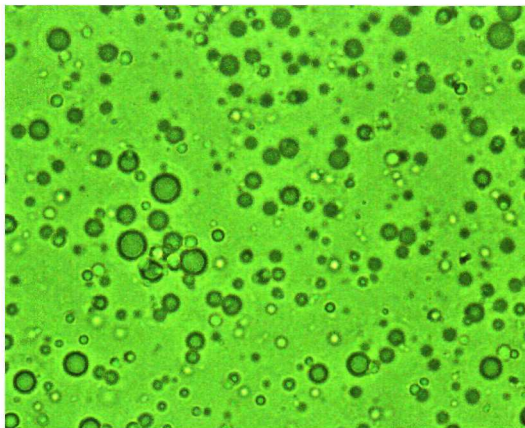
(B)



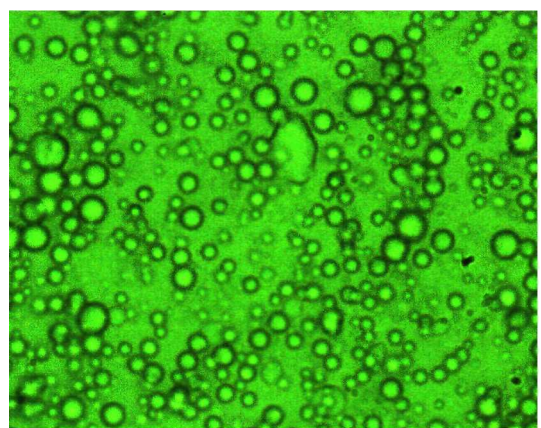
(C)



(D)

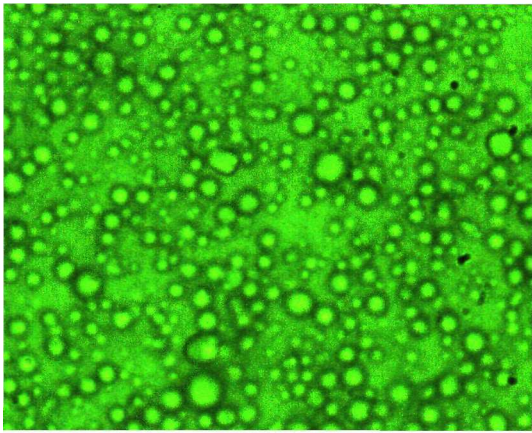


(E)

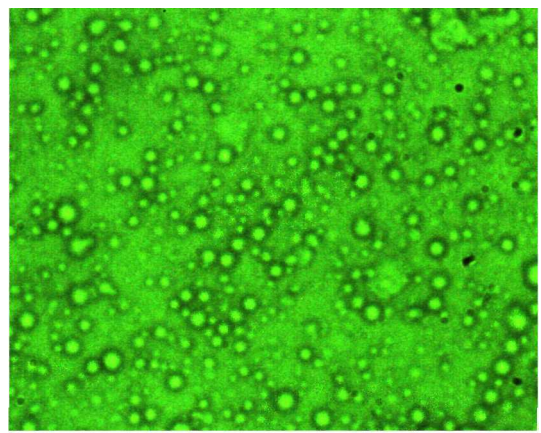


(F)

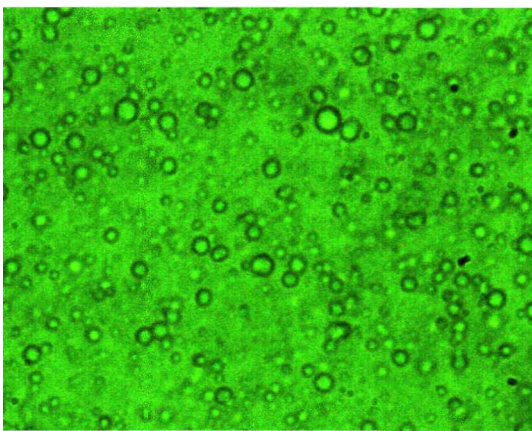




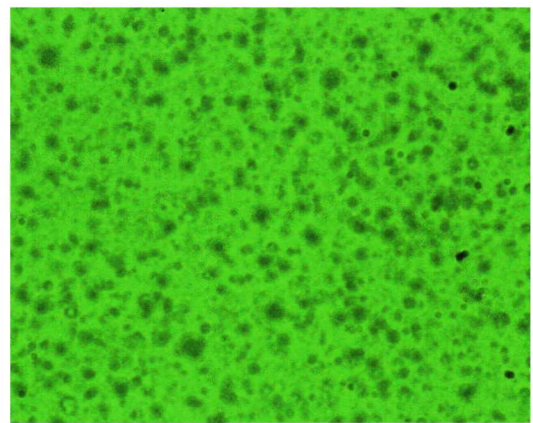
(G)



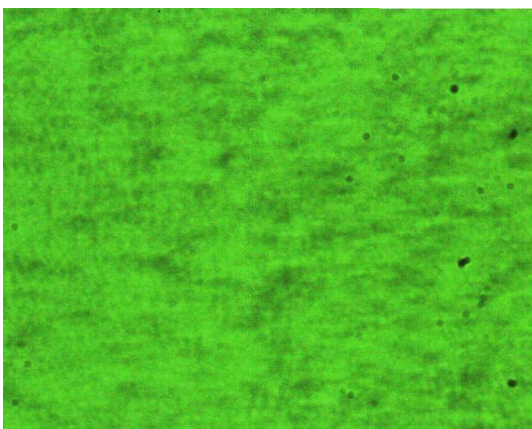
(H)



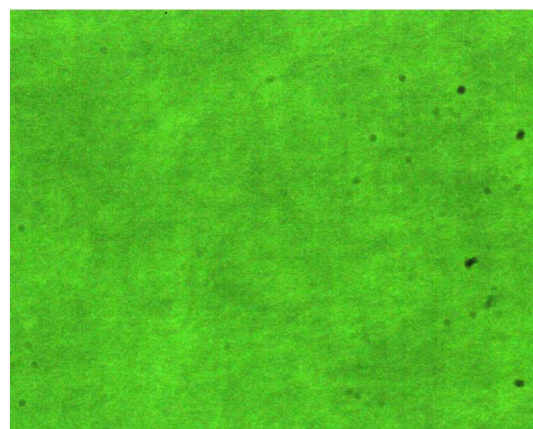
(I)



(J)



(K)



(L)

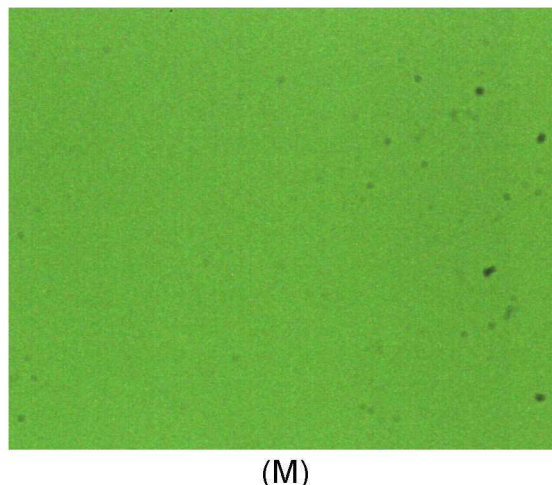


Figura 5.14 Micrografías de muestras de leche sometidas a irradiación ultrasónica durante diferentes tiempos: (A), sin tratamiento ultrasónico; (B), 1 minuto; (C), 2 minutos; (D), 3 minutos; (E), 4 minutos; (F), 5 minutos; (G), 10 minutos; (H), 15 minutos; (I), 20 minutos; (J), 25 minutos; (K), 30 minutos; (L), 35 minutos; (M), leche comercial ultrapasteurizada.

## 5.9 EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE EL COLOR DE LA LECHE BRONCA

El color, además de la viscosidad, es un factor importante para valorar la calidad del alimento ya que el consumidor inmediatamente puede evaluar un producto y aceptarlo o rechazarlo.

Los parámetros del color son (tabla 5.13):

Tabla 5.13 Características físicas del color

<b>Tinte, matiz o hue</b>	Se conoce como color (rojo, naranja, amarillo, etc.)
<b>Saturación, chroma o variación</b>	Pureza de un color respecto al gris. Dimensión de fuerza o debilidad de un color. (muy rojo o Menos rojo).
<b>Luminosidad, valor, tono, brillo o claridad</b>	Cualidad clara u oscura de un color en relación con el blanco o negro

FUENTE: Prado y Ávila, 2001



El color de la leche se midió mediante un colorímetro utilizando el sistema CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) de 1931, este método esta basado en un sistema tridimensional llamado diagrama cromático (fig. 5.15). Este diagrama está en términos de:  $y$ ,  $x$  y  $Y$ , en donde  $y$  y  $x$  son llamados coordenadas de cromaticidad y sirven para localizar el tinte o matiz mientras que  $Y$  indica la luminosidad.

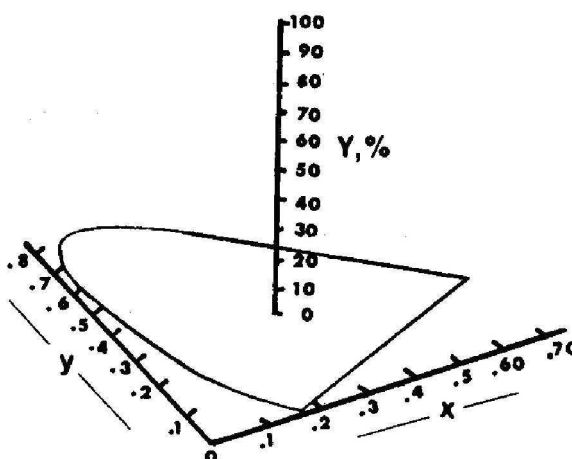


Figura 5.15 Diagrama cromático de la CIE representando la luminosidad  $Y$  (Franas, 1975)

Los resultados de la medición del color (tabla 5.14) se pueden localizar en el diagrama cromático. Así el punto A corresponde a todos los valores de las muestras tratadas ultrasónicamente desde 0 a 20 minutos y el punto B a las muestras tratadas a 25, 30 y 35 minutos (fig. 5.16).

Todas las muestras agrupadas en el punto A se sitúan en un color amarillo crema, cercanas al color blanco en el diagrama cromático con una luminosidad similar a leche sin tratar, sin embargo las muestras agrupadas en el punto B se alejan más del punto A y de la zona de los blancos y la luminosidad descende, se esperaba un resultado contrario que las muestras no se alejaran del amarillo crema y se acercaran más al color blanco, ésto porque se está llevando a cabo una reducción del tamaño de los glóbulos de grasa, lo que produce un mayor número de estas partículas dando como consecuencia la difracción de la luz mayor y la leche adquiere un color más blanco (Badui, 1999).

El color de la leche se debe fundamentalmente al efecto de la dispersión del espectro visible por los glóbulos de grasa y por otros componentes como el fosfato de calcio y las micelas de caseína y otros compuestos como los carotenos que le dan un color amarillento a la leche. Es probable que se este afectando la estructura química de los carotenos que le dan el color amarillento a la leche, es

decir, a mayor tiempo de sonicación dé como resultado un daño en la estructura del caroteno presente en la leche y cause cambios en el color.

Así Valero *et al.*, (2006) encontró que el color y la luminosidad se ven ligeramente afectados en jugo de naranja por la disminución del tamaño de partícula no da alguna otra explicación.

Tabla 5.14 Resultados de los parámetros de color en la leche

Tratamiento Ultrasónico (min)	Coordenadas de cromaticidad		Y
	X	Y	Luminosidad (%)
0	0.4410	0.4581	33.00
1	0.4424	0.4512	35.67
2	0.4371	0.4507	33.00
3	0.4482	0.4594	41.67
4	0.4446	0.4552	34.67
5	0.4452	0.4550	35.00
10	0.4466	0.4538	31.00
15	0.4509	0.4572	36.33
20	0.4505	0.4538	32.25
25	0.4924	0.5076	30.67
30	0.4921	0.5079	30.00
35	0.4928	0.5072	29.67

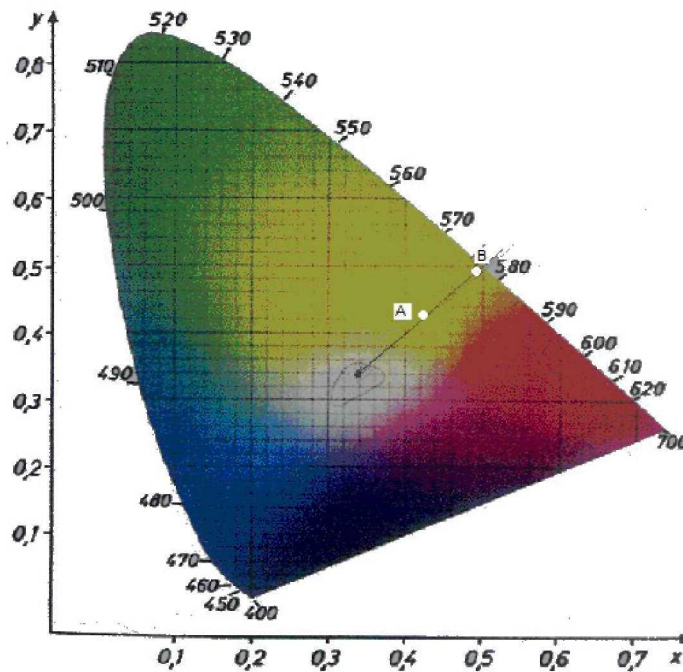


Figura 5.14 Diagrama cromático de la CIE en color (Zollinger, 1999)  
PUNTO A: Muestras tratadas ultrasónicamente de 0 a 20 min. PUNTO B:  
Muestras tratadas ultrasónicamente de 25 a 30 min.

## 5.10 EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LAS PROTEÍNAS DE LA LECHE BRONCA

Las proteínas evaluadas por electroforesis fueron de las leches irradiadas durante: 5, 10, 15, 20 y 35 min y leche sin tratar como testigo. Las bandas obtenidas para cada muestra así como el marcador de peso molecular (P.M.) se presentan en la figura 5.15.

Las muestras de proteína evaluadas mediante electroforesis fueron la leche irradiada a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20 y 35 min y leche sin tratar como testigo, además del peso molecular (P.M.) como marcador, en cada una de las columnas se distinguen las bandas de las proteínas presentes en la leche pertenecientes a cada una de las muestras si las filas de las bandas son más anchas es por la concentración de proteína (fig. 5.17).

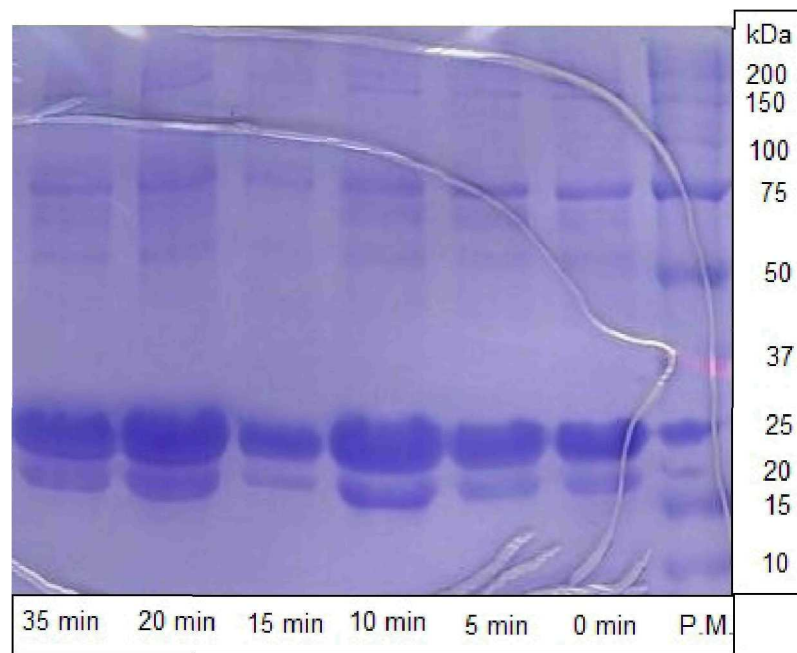


Figura 5.17 Muestra del gel de electroforesis de poliacrilamida de la leche irradiada por ultrasonido

Con el fin de obtener el peso molecular de las proteínas obtenidas en los carriles de todas las muestras de leche, se obtuvo una curva estándar con el PM del marcador (el marcador solo sirve para marcar el peso molecular en kDa) y su distancia recorrida (fig. 5.18). La ecuación obtenida del ajuste permite interpolar las distancias para determinar el peso molecular.

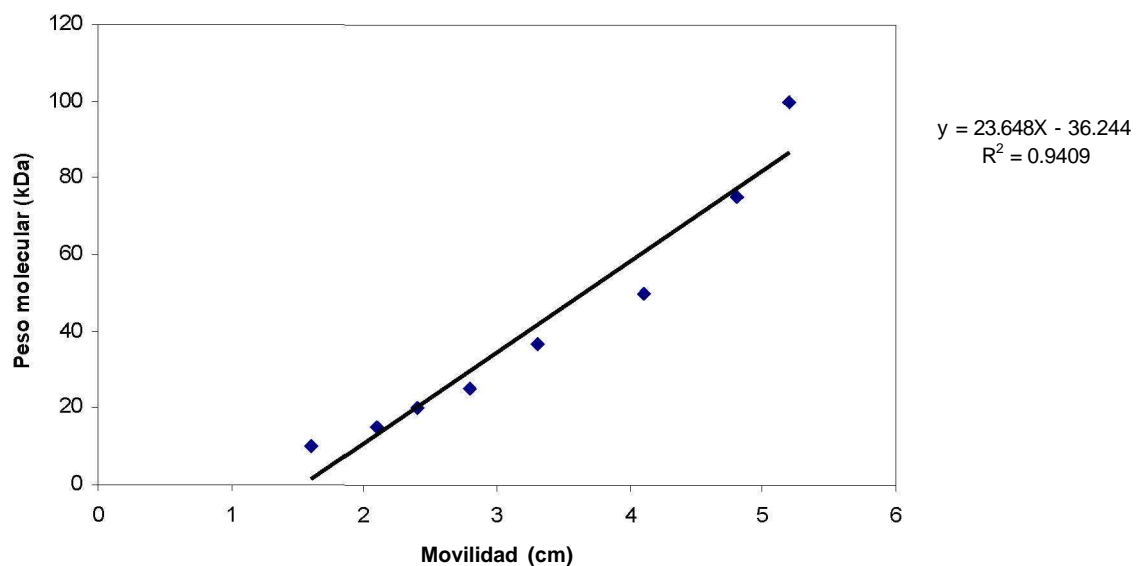


Figura 5.18 Gráfica de linearización del peso molecular de las proteínas

Con la ecuación anterior fue posible determinar los pesos moleculares experimentales de las proteínas, así los valores del peso molecular experimental son muy cercanos al peso molecular teórico, así fue posible determinar el tipo de proteína detectada por la electroforesis (tabla 5.15). La electroforesis detectó 7 proteínas en cada una de las bandas o diferentes muestras irradiadas entre las proteínas detectadas se encuentran la lactoglobulina, osteoponina, seroalbúmina, lactoferrina y la caseína proteína principal de la leche presentes en un 80% dentro de la leche y es la proteína se observa con un mayor grosor porque su concentración dentro de las muestras de leche es mayor respecto a las otras proteínas. La electroforesis no es un método selectivo y también detectó proteínas de tipo enzimático entre ellas la lipoproteína lipasa y otras enzimas. Aunque es difícil obtener la enzima exacta pues se tiene registro de 60 enzimas y sus pesos moleculares oscilan entre los 29 y 140 kDa, dentro de éstas se puede encontrar a la alcalina fosfatasa cuyo peso es de 140 kDa

Tabla 5.15 Comparación del peso molecular experimental y teórico de las proteínas de la leche

Movilidad (cm)	Peso molecular experimental (kDa)	Peso molecular teórico (kDa)	Tipo de Proteína
2.3	18.15	18.30	Lactoglobulina
2.7	27.61	19.00-24.00	Caseínas
4.1	60.71	60.00	Osteopontina
4.4	67.81	66.43	Seroalbúmina
4.8	77.27	75.00 - 78.00	Lactoferrina
5.6	96.18 – 137.00	96.90	Lipoproteína lipasa
5.7	98.55 – 141.00	29.00 – 140.00	Alguna de las 60 enzimas. (alcalina fosfatasa 140kDa)

Sin embargo el principal objetivo de realizar la electroforesis era saber si la estructura de la proteína de la leche se modificaba al ser sometida al tratamiento ultrasónico, es decir, si la proteína sufre una desnaturalización. Como ya se dijo se tienen 6 bandas que corresponden a cada una de las muestras de leche sometidas a irradiación y cada una de ellas tiene 7 subdivisiones están son las proteínas detectadas por la electroforesis, así al comparar las bandas de proteínas de la leche bronca sin tratamiento se observó que las demás bandas de proteína de leche sometidas al tratamiento ultrasónico no tuvieron ningún cambio en sus subdivisiones, pues no existe ninguna movilidad diferente producto del cambio de estructura de la proteína por el tratamiento ultrasónico. La

electroforesis muestra que no existe desnaturalización de las proteínas de leche sometida a tratamiento ultrasónico.

Un estudio encontrado para leche realizado por Villamiel y de Jong, (2000b) demostró que al estudiar 3 enzimas presentes en la leche, fosfatasa alcalina, glutamitranspeptidasa y lactoperoxidasa muestran que el efecto del ultrasonido es muy bajo en la degradación de las enzimas, pero al combinarlo con calor, entre 70 y 75.5°C, inactiva en un mayor porcentaje las enzimas. Para el caso de lactoalbúmina y lactoglobulina, se observó el mismo efecto que las enzimas mientras que la caseína no fue afectada ni con la combinación de ultrasonido-calor. Sin embargo, la temperatura usada en este trabajo es mucho menor a la relacionada con el artículo anterior, es decir, que los efectos a las proteínas pueden ser mínimos.

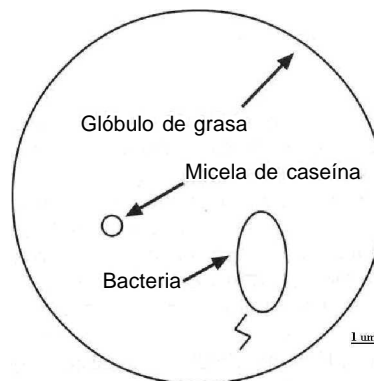


Figura 5.19 Diagrama esquemático de los tamaños relativos de un glóbulo de grasa, una bacteria y una micela de caseína. (1  $\mu\text{m}$  = 0.001 mm, 1 nm = 0.001  $\mu\text{m}$ ). (Cunningham, 2000).

Además Taylor y Richardson, (1980) encontró que las micelas de caseína (partículas esféricas que varían entre 40 a 300 nm, constituidas por 92% de proteínas y 8% de fosfato de calcio, fig. 5.19) pueden verse afectadas porque el ultrasonido disminuye su volumen haciendo micelas más pequeñas pero no afecta completamente su estructura y mucho menos la estructura de las caseínas individuales.

## 6. CONCLUSIONES

El ultrasonido muestra potencial para convertirse en una alternativa para la conservación de leche.

El ultrasonido con frecuencia de 22 kHz presenta la generación del fenómeno de cavitación en la leche.

El ultrasonido a temperatura ambiente, causa una disminución del 99% de la población de *E. coli* en la leche después de 35 minutos de tratamiento y de 90% para *S. aureus*.

Los cambios de pH y temperatura producto de la cavitación son mínimos y no dañan la leche.

El ultrasonido mostró un efecto positivo al combinarse con calor, ya que se logró eliminar la población microbiana estudiada.

La mejor muerte total de *E. coli*, en leche se logra a 60°C y 5 min de irradiación ultrasónica y a 50°C en 10 min de irradiación ultrasónica.

La mejor muerte total de *S. aureus*, en leche se logra a 60°C y 15 min de tratamiento ultrasónico.

Los valores D encontrados para las diferentes temperaturas (23,40, 50 y 60°C) fueron de 2.977, 2.042, 1.914 y 0.999 respectivamente para *E. coli* y para *S. aureus* de 7.067, 7.174, 6.596 y 2.668.

El valor Z para la termosonicación fue de 30, cuatro veces menos efectiva que los tratamientos térmicos convencionales

La leche irradiada durante 15 min a 60°C mostró una calidad microbiana muy parecida a la presentada por una leche comercial pasteurizada a 72°C.

La densidad de la leche disminuye después del tratamiento ultrasónico ya que disminuye el tamaño de los glóbulos de grasa pero aumenta la cantidad de éstos.

La viscosidad de la leche aumenta después del tratamiento ultrasónico por la homogenización de los glóbulos de grasa.

El tratamiento por ultrasonido afecta el color de la leche haciéndola mas amarilla

El tratamiento ultrasónico no tiene un efecto en las proteínas de la leche

La mejor homogenización de la leche se logró después de 30 minutos de irradiación ultrasónica.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Alais, C. (1998). *Ciencia de la leche*. México: Compañía Editorial Continental.

Alexandre, J.L. (1999). *Industrias Agroalimentarias*. España: Universidad Politécnica de Valencia.

Aguilar Ortega, T. (2001). "Impactos ambientales de la industria de alimentos y bebidas en el Distrito Federal. El tratamiento fiscal de la contaminación". Trabajo de grado. Maestría en Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Ingeniería, México.

Álvarez, I., Mañas, P., Sala, F.J. y Condón, S. (2003). Inactivation of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis by Ultrasonic Waves under Pressure at Different Water Activities. *Applied and Environmental of Microbiology*. 69(1): 668-672.

Álvarez, I., Mañas, P., Virto, R. y Condón, S. (2006.). Inactivation of *Salmonella* Senftenberg 775 W by ultrasonic waves under pressure at different water activities. *International Journal of Food Microbiology*. 108: 218-225.

Ananta, E., Voigt, D. y Knorr, D. (2005). Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 271-278.

Arce-García, M.R. Jimenez-Munguia, M.T., Palou, E., López-Malo S. (2002). Ultrasound treatments and antimicrobial effects on *Zygosaccharomyces rouxii*. *IFT Annual Meeting Book of Abstracts*.

Arzate Aguilera, J. D. y Flores Arrieta, M.A. (2003). "Evaluación de la composición química y la posible presencia de proteína de soya en salamis comerciales". Trabajo de grado. Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Astiasarán, I. y Martínez, J. A. (2003). *Alimentos, Composición y Propiedades*. España: McGraw-Hill.

Badui, S. (2002). *Química de los Alimentos*. México: Alhambra. 648p.

Bravo, M.F. (2002). *Manejo higiénico de los alimentos*. México: Limusa.

Brooks, G.F., Butel, J.S., y Morse, S.A. (1999). *Microbiología médica*. 16a. edición. México: Manual Moderno.

Cañameras, C. y Taurina, D. Alimentación ¿Leche pasteurizada o esterilizada? [en línea]. (2003). Disponible en <http://www.maristas.com.ar/champagnat/leche.htm>. [Consulta: noviembre de 2005].

CONAGUA, Comisión Nacional del Agua. Indicadores industriales en el uso del agua Industria Alimenticia. (2001). México.

Cunningham, A.I. (2000). Optimización de rendimiento y aseguramiento de inocuidad de la industria de la quesería [en línea]. Disponible en: [http://www.science.oas.org/OEA\\_GTZ/LIBROS/QUESO/cap2\\_que.htm](http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/QUESO/cap2_que.htm). [consulta: enero del 2007].

Dobler, J. (2000). Curso de lactología: principios técnicos generales de la elaboración de quesos. México: UNAM, FES-Cuautitlán.

Doyle, M. P. (2000). *Microbiología de los alimentos*. España: Acribia.

Dukhin, A.S., Goetz, P.J. y Travers, B. (2005). Use of ultrasound for characterizing Dairy Products. *Journal of Dairy Science*. 88: 1320-1334.

Entezari, M.H., Hagh, N. S y Haddad, M.H. (2004). The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms. *Ultrasonics Sonochemistry*. 11: 379-384.

Ertugay, M. F., Sengül, M. y Sengül, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenisation and particle size distribution of fat. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*. 28: 303-308.

Franas, F.J. y Clydesalde, F.M. (1975). *Food Colorimetry*. USA: The AVI publishing company.

Findik, S., Gündüz, G. y Gündüz, E. (2006). Direct sonication of acetic acid in aqueous solutions. *Ultrasonics sonochemistry*. 13: 203-207.

Food and Drug Administration (FDA). Ultrasound in the food, drug and device industries [en línea]. (1975). Disponible en: [http://www.fda.gov/ora/inspect\\_ref/itg/itg18.html](http://www.fda.gov/ora/inspect_ref/itg/itg18.html) [consultado en: marzo 2006].

Food and Drug Administration (FDA). Overarching Principles: Kinetics and Pathogens of Concern for All Technologies [en línea]. (2000). Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift-over.html> [consultado en: diciembre 2006].

Forsythe, J. (2003). *Alimentos seguros: microbiología*. España: Acribia.

García, M. L, Burgos, J., Sanz, B. y Ordoñez, J.A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 619-628.

Gould, G.W. (1989). Heat induced injury and inactivation. In Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. Londres: Elsevier Applied Science. Pp 11-42

Hiraoka, W., Honda, H., Feril, L, Kudo, N. y Kondo, T. (2005). Comparison between sonodynamic effect and photodynamic effect with photosensitizers on free radical formation and cell killing. *Ultrasonics Sonochemistry*. 6: 1-8.

ICSMF, International Commission on Microbiological Specifications for Food (Comisión Internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos). (1998). *Microorganismos de los alimentos*. España: Acribia.

ICSMF, International Commission on Microbiological Specifications for Food (Comisión Internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos). (2001). *Microorganismos de los alimentos 6: Ecología microbiana de los productos alimentarios*. España: Acribia.

Inoue, M., Okada, F., Sakurai, A. y Sakakibara, M. (2006). A new development of dyestuffs degradation system using ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*. 13: 313-320.

INEGI, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información. Estadísticas del Sector Salud y Seguridad Social, cuaderno no. 20 [en línea]. (2003). Disponible en: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx). [consulta: octubre 2005]

INFOPRESSCA Servicio de información municipal de Guatemala. Efectos del agua oxigenada sobre la leche [en línea]. Disponible en: [http://www.inforpressca.com/sanpedrocarcha/investigacion\\_leche.pdf](http://www.inforpressca.com/sanpedrocarcha/investigacion_leche.pdf) . [consulta: diciembre del 2006].

- Jacob, M. (1989). *Safe Food Handling: A Training Guide for Managers of Food Service Establishments*. Geneva: World Health Organization.
- Jayasooriya, S.D., Bhandari, B.R., Torley, P. y D'Arcy, B.R. (2004). Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: a review. *International journal of food properties*. 7(2): 301-319.
- Joyce, E., Phull, S.S., Lorimer, J.P. y Mason, T.J. (2003). The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrasonics Sonochemistry*. 10: 315-318.
- Karel, M. y Lund, D. (2003). *Physical Principles of Food Preservation*. 2a edición. USA: Marcel Dekker
- Keating, P.F. y Gaona, H. (1999). *Introducción a la Lactología*. Mexico: Limusa.
- Kremkau, F. W. (2002). *Diagnostic ultrasound*. USA: Saunders, Elsevier.
- Kuldiloke, J. "Effect of Ultrasound, Temperature and Pressure Treatments on Enzyme Activity and Quality Indicators of Fruit and Vegetable Juices" [en línea]. Tag der wissenschaftliche Aussprache. (Berlin 2002). Disponible en: [http://edocs.tu-berlin.de/diss/2002/kuldiloke\\_jarupan.pdf](http://edocs.tu-berlin.de/diss/2002/kuldiloke_jarupan.pdf). [fecha de consulta septiembre 2005].
- LAROUSSE. (2004). La alimentación ¿Que comemos?. Colección Larousse. El mundo Contemporáneo.
- Lempriere, B.M. (2002). *Ultrasound and elastic waves*. USA: Academic Press.
- Lewis, M.J. (1993). *Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado*. España: Acribia.
- Madge, B.A. y Jensen, J.N.(2002). Desinfection of wastewater using a 20 kHz ultrasound unit. *Water Environment Research*. 74 (2): 159-169.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos*. 10ª edición. España: Prentice Hall.
- Madrid, V. (1990). *Manual de Industrias lácteas*. España: Mundi-Prensa Libros.
- Manas, P. y Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by new technologies of food preservation. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1387-1399.

Mark, G., Tauber, A., Laupert, R., Schuchmann H., Schulz, D., Mues, A. y Sonntag, C. (1998). OH-radical formation by ultrasound in aqueous solution - Part II: Terephthalate and Fricke dosimetry and the influence of various conditions on the sonolytic yield. *Ultrasonics Sonochemistry*. 5: 41-52.

Mason, T.J., Paniwnyk, L. y Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 3: S253-S260.

Mason, T.J. y Paniwnyk, L. (2003). "Ultrasound as a preservation technology". En: Zeuthen, P. *Food Preservation Techniques*. USA: CRC Press.

Mossel, D.A.A. y Moreno, B. (1985). *Microbiología de los Alimentos*. España: Acribia.

Mossel, D.A.A., Moreno, B. y Strujik, T.C.B. (2003). *Microbiología de los Alimentos*. 2a edición. España: Acribia.

Mulet, A., Benedito, J., Golas, Y. y Cárcel, J.A. (2002a). Noninvasive Ultrasonic Measurements in the food industry. *Food Reviews International*. 18(2-3): 123-133.

Mulet, A., Cárcel, J.A., Benedito, J. y Sanjuán, N. (2002b). "Applications of low intensity Ultrasonics in the Dairy Industry". En: Welti-Chanes, J. *Engineering and Food for the 21st century*. Inglaterra: CRC Press.

Niemczewski, B. (2006). Observations of water cavitation intensity under practical ultrasonic cleaning conditions. *Ultrasonics sonochemistry* : 1-5

Norma Oficial Mexicana. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias. NOM-091-SSA1-1994. México: Diario Oficial de la Federación, 1995a.

Norma Oficial Mexicana Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. NOM-112-SSA1-1994. México: Diario Oficial de la Federación, 1995b.

Olvera Luna, M. E. (2005). "Ultrasonido como tecnología sostenible para desinfección de microorganismos patógenos". Trabajo de grado: Maestría en Desarrollo Sostenible. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey.

OPS, Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades Transmitidas por Alimentos [en línea]. (2002). Disponible en:

<http://www.panalimentos.org/panalimentos/educacion/educacion1.asp?cd=298&id=67>. [consulta: octubre 2005]

OPS, Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos [en línea]. Disponible en: [http://www.panalimentos.org/sirveta/e/frmggrafb\\_02.asp](http://www.panalimentos.org/sirveta/e/frmggrafb_02.asp) . [consulta: 20 de noviembre 2006]

Ordoñez, J. A., Aguilera, M.A. García, M.L. y Sanz, B. (1987). Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Research*. 54: 61-67.

Ortuño, M. (1996). *Física para biología, medicina, veterinaria y farmacia*. España: nuevos instrumentos universitarios.

Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 207-216

Povey, M. J. W. (1998a). Ultrasonics in Food. *Contemporary Physics* 39 (6): 467-478

Povey, M. y Mason, T. (1998b). *Ultrasound in Food Processing*. Londres: Blackie Academic & Professional.

Prado-León, L. y Avila-Chaurona, R. (2001). *Factores ergonómicos en el diseño*. México: Universidad Guadalajara Coordinación editorial.

PROFECO, Procuraduría Federal del Consumidor. Quesos de leche bronca pueden provocar enfermedades [en línea]. (julio 2005). Disponible en: [http://www.profeco.gob.mx/alertas/alertas05/alertas\\_quesos.asp](http://www.profeco.gob.mx/alertas/alertas05/alertas_quesos.asp). [consulta: noviembre 2005].

Raso, J., Pagán, R., Condón, S. y Sala, F.J. (1998a). Influence of Temperature and Pressure on the Lethality of Ultrasound. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2): 465-471.

Raso, J., Palop, A., Pagán, R. y Condón, S. (1998b). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combining ultrasonic waves under pressure and mild heat treatment. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 849-854.

Revilla, A. (1983). *Tecnología de la leche*. México: Herrero Hermanos, sucesores.

- Riel, R. (1991). "Composición y estructura físico-química de la leche". En: Amiot, J. *Ciencia y Tecnología de la leche*. España: Acribia.
- Robinson, R.K. (1995). *Microbiología Lactológica Vol. 1*. España: Acribia.
- Rodríguez, F. (2000). *Ingeniería de la Industria Alimentaria Vol. 3*. España: Síntesis.
- Ross, A., Griffiths, M. W., Mittal, G. S. y Deeth, H. C. (2003). Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms, *International Journal of Food Microbiology* 89: 125-138.
- Samari S. (1994). Ultrasonic Inspection Methods for Food Products. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 27: 210-213.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Panorama Mundial de la leche [en línea]. (Abril 2002). Disponible en <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/anleche.html>. [fecha de consulta octubre 2005].
- Sanders, T. A. B. (1999). Food production and food safety, *Education and debate* 318:25-27.
- Scherba, G., Weigel, R.M. y O'Brien, W.D. (1991). Quantitative Assessment of the Germicidal Efficacy of Ultrasonic Energy. *Applied and Environmental Microbiology*. 57(7): 2079-2084.
- Schlinmme, E. y Buchheim, W. (2002). *La leche y sus componentes*. España: Acribia.
- Scouten, A.J y Beuchat, L.R. (2002). Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 668-674.
- Spreer, E. (1991). *Lactología Industrial*. 2a edición. España: Acribia.
- Taylor, M.J. y Richardson, T. (1980). Antioxidant activity of skim milk: Effect of sonication. *Journal of Dairy Science*. 63: 1938-1942
- Toral Peña, N. M. (2004). "Validación del método de electroforesis en gel de acril-bisacrilamida". Trabajo de grado. Licenciatura en Ingeniería en Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México.

Universidad de Guadalajara. Microbiología de la leche cruda [en línea]. (2004). Disponible en: <http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/26mar04/Microbiologia%20de%20la%20Leche%20cruda.txt>. [Consulta: Octubre de 2005].

Vaclavik, V. A. (2003). *Fundamentos de Ciencia de los Alimentos*. España: Acribia.

Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N. y Lizama, V. (2006). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*. 10: 1-8

Varnam, A.H. y Sutherland, J.P. (1995). *Leche y productos lácteos*. España: Acribia

Vercet, A., López, P. y Burgos, J. (1998). Free Radical production by manothermosonication. *Ultrasonics*. 36: 615-618.

Villamiel, M. y de Jong, P. (2000a). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering*. 45: 171-179.

Villamiel, M. y de Jong, P. (2000b). Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in continuous Flow on Fat, Proteins and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agricultura! Food Chemistry*. 48: 472-478.

Warner, J.N. (1979). *Principios de la tecnología de lácteos*. México: AGT editores.

Zavala Pope, M. Aspectos nutricionales y tecnológicos de la leche [en línea]. (2005). Disponible en: [http://www.minag.gob.pe/dgpa1/ARCHIVOS/agroin\\_doc2.pdf](http://www.minag.gob.pe/dgpa1/ARCHIVOS/agroin_doc2.pdf) [consulta en: diciembre 2006].

Zagzebski, J. A. (1996). *Essentials of ultrasounds physics*. USA: Mosby Elsevier Science.

Zheng, L. y Da-Wen, S. (2006). Innovate applications of power ultrasound during food freezing processes- a review. *Trends in food Science and Technology*. 17: 16-23.

Zollinger, H. (1999). *Color a multidisciplinary approach*. Nueva York: Wiley-VCH.



## ANEXO A: Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa matemático Minitab para cada uno de los parámetros así se comparó cada uno de ellos contra el tiempo y temperatura según correspondiera:

### A.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL COMPORTAMIENTO DEL PH EN LA LECHE

Hipótesis:  $t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9 = t_{10} = t_{11} = t_{12}$

Tabla A.1 Análisis de varianza de pH para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	11	0.050341 7	0.050341 7	0.004576 5	6.22	0.000
Error	24	0.017666 7	0.017666 7	0.000736 1		
Total	35	0.068008 3				

S = 0.0271314 R-Sq = 74.02% R-Sq(adj) = 62.12%

Al obtener un P-value de 0.000 y una  $r^2$  de 62.12% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre el pH con un nivel de significancia de un 0.01.

### A.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL COMPORTAMIENTO DE TEMPERATURA EN LA LECHE

Hipótesis:  $t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9 = t_{10} = t_{11} = t_{12}$

Tabla A.2. Análisis de varianza de temperatura para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	11	596.268	596.268	54.206	1726.92	0.000

Error	24	0.753	0.753	0.031		
Total	35	597.021				

$$S = 0.177169 \quad R\text{-Sq} = 99.87\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 99.82\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 99.82% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la temperatura por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

### A.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL COMPORTAMIENTO DE DENSIDAD EN LECHE

Hipótesis:  $t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9 = t_{10} = t_{11} = t_{12}$

Tabla A.3 Análisis de varianza de densidad para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	11	0.0000556	0.0000556	0.0000051	14.82	0.000
Error	24	0.0000082	0.0000082	0.0000003		
Total	35	0.0000638				

$$S = 0.000583795 \quad R\text{-Sq} = 87.17\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 81.29\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 81.29% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la densidad con un nivel de significancia de un 0.01.

### A.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL COMPORTAMIENTO DE VISCOSIDAD EN LECHE

Hipótesis:  $t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9 = t_{10} = t_{11} = t_{12}$

Tabla A.4. Análisis de varianza de viscosidad para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	11	1.14069	1.14069	0.10370	37331.64	0.000
Error	24	0.00007	0.00007	0.00000		
Total	35	1.14076				

$$S = 0.00166667 \quad R\text{-Sq} = 99.99\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 99.99\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 99.99% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la viscosidad en leche por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

## A.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA EVALUACIÓN DEL COLOR EN LECHE

Hipótesis:  $t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9 = t_{10} = t_{11} = t_{12}$

Tabla A.5. Análisis de varianza de color del parámetro x para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	11	0.0155704	0.0155704	0.0014155	104.46	0.000
Error	24	0.0003252	0.0003252	0.0000136		
Total	35	0.0158956				

S = 0.00368103 R-Sq = 97.95% R-Sq(adj) = 97.02%

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 97.02% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la viscosidad en leche por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A.6. Análisis de varianza de color del parámetro y para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	11	0.0187880	0.0187880	0.0017080	53.05	0.000
Error	24	0.0007727	0.0007727	0.0000322		
Total	35	0.0195607				

S = 0.00567419 R-Sq = 96.05% R-Sq(adj) = 94.24%

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 94.24% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la viscosidad en leche por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

## A.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA DISMINUCIÓN DE GLÓBULOS DE GRASA EN LECHE

Hipótesis:  $t_1 = t_2 = t_3 = t_4 = t_5 = t_6 = t_7 = t_8 = t_9 = t_{10}$

Tabla A.7 Análisis de varianza de homogenización para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	9	422.392	422.392	46.932	8.25	0.000
Error	190	1080.945	1080.945	5.689		
Total	199	1503.337				

$$S = 2.38520 \quad R\text{-Sq} = 28.10\% \quad R\text{-Sq(aj)} = 24.69\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  muy baja de 24.69% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la homogenización de los glóbulos de grasa en leche por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

## A.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE *E. coli* EN LECHE

Hipótesis:  $T_1=T_2=T_3=T_4$

Se realizó un ANOVA a las diferentes temperaturas y a cada uno de los tiempos que se publicaron en la tabla 6.6 y 6.7

Tabla A.8 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *E. coli* al tiempo 1 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	2635489167	2635489167	878496389	15.54	0.001
Error	8	452193333	452193333	56524167		
Total	11	3087682500				

$$S = 7518.26 \quad R\text{-Sq} = 85.35\% \quad R\text{-Sq(aj)} = 79.86\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 79.86% podemos rechazar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A.9 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *E. coli* al tiempo 2 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	3419549383	3419549383	1139849794	23.42	0.000

Error	20	973447800	973447800	48672390		
Total	23	4392997183				

$$S = 6976.56 \quad R\text{-Sq} = 77.84\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 74.52\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 74.52% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A. 10 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *E. coli* al tiempo 3 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	4160985341	4160985341	1386995114	32.35	0.000
Error	32	1372010285	1372010285	42875321		
Total	35	5532995626				

$$S = 6547.92 \quad R\text{-Sq} = 75.20\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 72.88\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 72.88% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A.11 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *E. coli* al tiempo 4 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	3671248584	3671248584	1223749528	22.22	0.000
Error	44	2423119483	2423119483	55070897		
Total	47	6094368066				

$$S = 7420.98 \quad R\text{-Sq} = 60.24\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 57.53\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 57.53% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A. 12 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *E. coli* al tiempo 5 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	3209473350	3209473350	1069824450	18.18	0.000
Error	56	3295136829	3295136829	58841729		
Total	59	6504610179				

$$S = 7670.84 \quad R\text{-Sq} = 49.34\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 46.63\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 46.63% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A. 13. Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *E. coli* al tiempo 10 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	2816179217	2816179217	938726406	15.98	0.000
Error	68	3995521799	3995521799	58757674		
Total	71	6811701016				

$$S = 7665.36 \quad R\text{-Sq} = 41.34\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 38.76\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 38.76% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

## A.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA EL EFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE *S. aureus* EN LECHE

Hipótesis:  $T_1=T_2=T_3=T_4$

Tabla A. 14 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *S.aureus* al tiempo 3 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	46909133833	46909133833	15636377944	16.48	0.000
Error	113	1.07225E+11	1.07225E+11	948895582		
Total	116	1.54134E+11				

$$S = 30804.1 \quad R\text{-Sq} = 30.43\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 28.59\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 28.59% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A. 15 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *S.aureus* al tiempo 5 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	30766452012	30766452012	10255484004	8.83	0.000

Error	89	1.03396E+11	1.03396E+11	1161749594		
Total	92	1.34162E+11				

$$S = 34084.4 \quad R\text{-Sq} = 22.93\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 20.33\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 20.33% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A. 16 Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *S.aureus* al tiempo 10 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	42325975815	42325975815	14108658605	13.34	0.000
Error	101	1.06823E+11	1.06823E+11	1057656500		
Total	104	1.49149E+11				

$$S = 32521.6 \quad R\text{-Sq} = 28.38\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 26.25\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 26.25% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.

Tabla A. 17. Análisis de varianza del efecto del ultrasonido sobre *S.aureus* al tiempo 15 min para la clasificación en una dirección

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
C1	3	46909133833	46909133833	15636377944	16.48	0.000
Error	113	1.07225E+11	1.07225E+11	948895582		
Total	116	1.54134E+11				

$$S = 30804.1 \quad R\text{-Sq} = 30.43\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 28.59\%$$

Al obtener un P-value de 0.00 y una  $r^2$  de 28.59% podemos aceptar la hipótesis de que el tiempo no influye sobre la muerte microbiana por irradiación ultrasónica con un nivel de significancia de un 0.01.