



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**Efecto de procesos asistidos con ultrasonido de potencia
en leche bovina adicionada con bacterias ácido lácticas
sobre el perfil fermentativo, tasa de crecimiento y
componentes de la leche**

TESIS DE MAESTRÍA

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRO(A) EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

PAULINA ALEJANDRA ALBORES ALFARO

DIRECTOR(A):

DRA. PAOLA HERNÁNDEZ CARRANZA

CODIRECTOR(A):

DR. HECTOR RUIZ ESPINOSA

BUAP

H. Puebla Z., Diciembre 2017



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN INGENIERÍA QUÍMICA



ACTA DE REVISIÓN, LIBERACIÓN E IMPRESIÓN DE TESIS

Nombre del estudiante: PAULINA ALEJANDRA ALBORES ALFARO

Matrícula: 215471050

Nombre del director: DRA PAOLA HERNÁNDEZ CARRANZA

Nombre del codirector: DR. HÉCTOR RUIZ ESPINOSA

Título de la Tesis:

"EFECTO DE PROCESOS ASISTIDOS CON ULTRASONIDO DE POTENCIA EN LECHE BOVINA
ADICIONADA CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE EL PERFIL FERMENTATIVO, TASA DE
CRECIMIENTO Y COMPONENTES DE LA LECHE"

Comisión Revisora:

Presidente: Dr. Irving Israel Ruiz López

Secretario(a): Dra. Edith Corona Jiménez

Vocal (1): Dr. Héctor Ruiz Espinosa

Vocal (2): Dra. Paola Hernández Carranza

Firma: _____

Firma: _____

Firma: _____

Firma: _____

Los integrantes de la Comisión Revisora expresamos que hemos leído y revisado el manuscrito de la tesis de maestría que presenta el (la) estudiante arriba indicado, por lo que **estamos de acuerdo en que se proceda con la impresión definitiva de la tesis y que el (la) estudiante presente su defensa y examen de grado en la fecha, horario y lugar que se indican a continuación.**

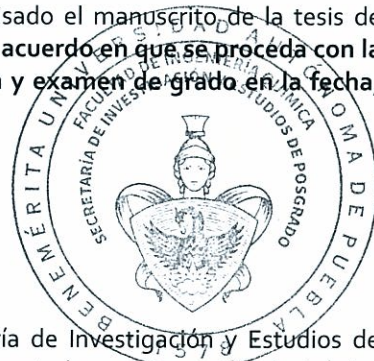
Fecha de examen: 14 de Diciembre de 2017

Hora: 12:00 hrs

Día de la semana: Jueves

Lugar: Fiq 7 301

Indicaciones: Entregar original para su revisión y autorización en la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado (SIEP). La copia de este documento deberá ser incluida en la tesis empastada y en su versión electrónica





BUAP

Oficio: FIQ/SIEP/127/2017

Mtro. Omar Aguirre Ibarra
Director de Administración Escolar
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Reciba un afectuoso saludo y al mismo tiempo me permito presentar a usted a los integrantes del jurado de examen que para obtener el grado de Maestra en Ingeniería Química sustentará la

Ing. Paulina Alejandra Albores Alfaro

perteneciente a la generación 2015 con número de matrícula 215471050 y cuyo tema de tesis es: **"EFECTO DE PROCESOS ASISTIDOS CON ULTRASONIDO DE POTENCIA EN LECHE BOVINA ADICIONADA CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE EL PERFIL FERMENTATIVO, TASA DE CRECIMIENTO Y COMPONENTES DE LA LECHE"**. Dicho jurado está integrado por:

JURADO

Presidente:	Dr. Irving Israel Ruiz López
Secretario:	Dra. Edith Corona Jiménez
Vocal:	Dr. Héctor Ruiz Espinosa
Vocal:	Dra. Paola Hernández Carranza

Asimismo, comunico a usted que el alumno cumple con todos los requisitos para poder llevar a cabo su examen de grado y que los integrantes de este jurado están citados con anticipación para la fecha y lugar indicados a continuación.

FECHA DE EXAMEN:	14 de diciembre de 2017
HORA:	12:00 horas
LUGAR:	Facultad de Ingeniería Química, FIQ7/301
DÍA:	Jueves

Sin otro particular, me es grato quedar de usted.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z. a 08 de diciembre de 2017

Dr. Irving Israel Ruiz López
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado



80 AÑOS
DE UNIVERSIDAD

c.c.p. Archivo
E-mail: irving.ruiz@correo.buap.mx

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a mis padres que son parte fundamental en mi vida, ya que sin su apoyo no estaría donde ahora me encuentro, los reconozco por ser unas personas extraordinarias que siempre me han guiado con su enorme ejemplo.

Agradezco a Conacyt y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por abrirme las puertas y brindarme la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado. A mis asesores Dra. Paola Hernández Carranza y Dr. Héctor Ruiz Espinosa gracias por su apoyo incondicional, por su paciencia y enseñanza, pero sobre todo muchas gracias por brindarme un lugar en su equipo de trabajo. A mis síndos Dr. Irving I. Ruiz López y Dra. Edith Corona Jiménez, gracias por su tiempo y las sugerencias que permitieron enriquecer esta tesis.

Agradezco de forma especial a los colaboradores que enriquecieron este trabajo, al M.C. Martín Ruvalcaba por su apoyo en la estancia de investigación en el Centro Nacional de Recursos Genéticos campus Tepatitlán, Jalisco; a la Dra. Gabriela Alvarado en la realización de la identificación de las especies de bacterias ácido lácticas por la técnica de PCR en el Instituto Politécnico de Puebla; al Dr. Carlos Ochoa por el apoyo en las dudas surgidas. También le doy gracias a la MES. Madai Gizeh Sánchez Arzubide por apoyarme en los laboratorios.

Agradezco de una manera muy especial a mi compañero de vida Arq. José Ramón Canseco López por todo el apoyo y el amor que me brinda cada día, también a mi hermana Daniela Albores por estar presente siempre. A mis amigos Sergio Velasco y Fabiola Gómez que sin ellos no hubiera realizado todo esto con alegría. A mis compañeros de maestría Mayda, Yuriana, Oscar, Mariana, Eloina, Johanes que me apoyaron cuando más los necesité y en especial a Esme por hacerme más fácil la comprensión de muchos parámetros estudiados.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos particulares.....	7
MARCO TEÓRICO	8
1. Leche	8
1.1. Definición	8
1.2. Composición química de la leche.....	8
1.2.1. Agua.....	9
1.2.2. Proteína.....	9
1.2.2.1 Caseína.....	10
1.2.2.2 Factores que afectan a la estabilidad de la micela de caseína	12
1.2.2.3 Proteínas de suero	13
1.2.3. Grasa	13
1.2.4. Carbohidratos	15
1.2.5. Vitaminas y minerales	15
1.2.6. Enzimas.....	16
1.2.7. Procesos que afectan la composición química de la leche	17
1.3. Propiedades fisicoquímicas de la leche.....	18
1.4. Tipos de leche	19
1.4.1. Leche entera	19
1.4.2. Leche descremada y parcialmente descremada.....	19
1.5. Productos lácteos.....	20
1.5.1 Quesos artesanales	21
1.5.1.1 Queso adobera.....	21
1.6. Bacterias ácido lácticas (BAL).....	22

1.6.1. Características generales	22
1.6.2. Clasificación de bacterias ácido lácticas	23
1.6.3. Bacterias ácido lácticas aplicadas en alimentos	24
1.6.4. <i>Lactococcus lactis</i> como cultivo iniciador	24
1.6.4.1. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y su aplicación en alimentos.....	25
1.7 Tecnologías emergentes	25
1.7.1 Generalidades	25
1.7.2 Clasificación	25
1.7.3. Principio de funcionamiento del ultrasonido	27
1.7.3.1. Clasificación del ultrasonido	28
1.7.3.2. Dispositivos ultrasónicos de potencia	29
1.7.3.3. Aplicación del ultrasonido en alimentos	30
1.7.3.4 Efectos del ultrasonido en microorganismos	30
1.7.3.5. Efecto del ultrasonido en bacterias ácido lácticas.....	32
1.7.3.6. Aplicación del ultrasonido de potencia en leche y sus derivados.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Materia prima	35
2.2. Métodos	35
2.3. Identificación y preservación de microorganismos	35
2.4. Caracterización genotípica de microorganismos.....	36
2.5. Pruebas bioquímicas	37
2.6. Curvas de crecimiento	38
2.7. Parámetros de crecimiento.....	38
2.8. Cinéticas de acidificación.....	39
2.9. Selección de la cepa.....	39
2.10. Preparación de los sistemas e inoculación del microorganismo	40
2.11. Aplicación de US de potencia.....	40
2.12. Determinación de potencia efectiva por calorimetría	41
2.13. Efecto de la aplicación de US de potencia en leche	43
2.13.1. Comportamiento microbiano	43
2.13.2. Parámetros de crecimiento.....	43
2.13.3. Acidez	43
2.13.4. Morfología del glóbulo de grasa	43

2.12.5. Cuantificación de aminoácidos libres.....	43
2.14. Análisis estadístico.....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1. Identificación de microorganismos presentes en queso adobera comercial.....	46
3.2. Pruebas bioquímicas.....	48
3.3. Curvas de crecimiento.....	49
3.4. Parámetros de crecimiento.....	51
3.5. Cinética de acidificación.....	52
3.6. Selección de la cepa.....	54
3.7. Aplicación de ultrasonido de sonda.....	54
3.8. Potencia efectiva por calorimetría de ultrasonido de potencia	57
3.9. Aplicación del ultrasonido de potencia sobre el comportamiento microbiano de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche bovina.....	58
3.10. Efecto el ultrasonido de potencia sobre los parámetros de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	61
3.11. Efecto del ultrasonido de potencia sobre la acidificación de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en los sistemas de leche.	64
3.12. Efecto del ultrasonido de potencia sobre los componentes de la leche (grasa)...	70
3.13. Efecto del ultrasonido de potencia sobre el contenido de aminoácidos.....	72
CONCLUSIONES.....	77
RECOMENDACIONES.....	79
REFERENCIAS	80
ANEXO A.....	99
ANEXO B	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de las proteínas lácteas.	10
Figura 2. Estructura de la micela de caseína propuesta por Walstra y Jenness en 1984, A: sub-micela, B: cadena sobresaliente, C: fosfato de calcio, D: κ -caseína, E: grupos fosfatos.	11
Figura 3. Estructura general del glóbulo de grasa de la leche.	14
Figura 4. Estructura de la lactosa.	15
Figura 5. Proceso de cavitación generado durante la aplicación de ultrasonido.	28
Figura 6. Transductores ultrasónicos de (a) sonda y (b) baño.	30
Figura 7. Sistema de 1) baño y 2) sonda ultrasónica.	30
Figura 8. Pesada de la biomasa celular (a) y extracción de ADN de la biomasa celular (b).	36
Figura 9. Adición de ADN en el gel de agarosa.	36
Figura 10. Termociclador My-Cicler.	37
Figura 11. Método de siembra de Miles y Misra.	38
Figura 12. Aplicación de tratamientos con baño ultrasónico.	40
Figura 13. Aplicación de tratamientos con ultrasonido de sonda.	41
Figura 14. Gel de electroforesis de agarosa al 0.8% con una banda en cada carril de 600 pb.	46
Figura 15. Gel de electroforesis de agarosa al 0.8% con una banda de 100 pb correspondiente a la cepa 48.	47
Figura 16. Tinción de Gram de la cepa 12 observada en microscopio óptico a 100x.	49
Figura 17. Curvas de crecimiento de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera.	50
Figura 18. Cinética de acidificación (% ácido láctico) de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera.	53
Figura 19. Cinética de pH de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera.	53
Figura 20. Cinética de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> inoculado en leche parcialmente descremada y tratada con US de sonda.	55
Figura 21. Cinética de acidificación (% ácido láctico) de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> inoculado en leche parcialmente descremada y tratado con US de sonda.	55
Figura 22. Cinética de pH de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> inoculado en leche parcialmente descremada y tratada con US de sonda.	56
Figura 23. Cinética de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de baño.	60
Figura 24. Cinética de crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de sonda.	61
Figura 25. Cinética de acidificación (% de ácido láctico) de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de baño.	65
Figura 26. Cinética de pH de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de baño.	66

Figura 27. Cinética de acidificación (% de ácido láctico) de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de sonda.....	68
Figura 28. Cinética de pH de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de sonda.	69
Figura 29. Glóbulo de grasa de leches entera (E), parcialmente descremada (PD) y descremada (D), inoculadas con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y tratadas con US de baño a diferentes tiempos (min), mediante microscopio óptico a 40x.	71
Figura 30. Glóbulo de grasa de leches entera (E), parcialmente descremada (PD) y descremada (D), inoculadas con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y tratadas con US de sonda a diferentes tiempos (min), mediante microscopio óptico a 40x.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca (por cada 100 g).	9
Tabla 2. Aplicación del ultrasonido de potencia en alimentos.	31
Tabla 3. Efecto del ultrasonido en los procesos de leche y sus derivados.	33
Tabla 4. Dilución de la fracción de citrato para la prueba de aminoácidos libres.	44
Tabla 5. Preparación de la curva de calibración de Leucina (Leu).	45
Tabla 6. Velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) y tiempo de duplicación (td) de cepas aisladas de queso adobera.	51
Tabla 7. Potencia efectiva real entregada a los sistemas tratados con ultrasonido de sonda.	57
Tabla 8. Velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) y tiempo de duplicación (td) de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> inoculado en leche bovina sonicada con US de baño.	62
Tabla 9. Velocidad de crecimiento máxima (μ_{max}) y tiempo de duplicación (td) de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> inoculado en leche bovina sonicada con US de sonda.	63
Tabla 10. Análisis de varianza de cambios de acidez (% de ácido láctico) en los sistemas de leche inoculados con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y sonicados con US de baño.	67
Tabla 11. Análisis de varianza de cambios de pH en sistemas de leche inoculados con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y sonicados con US de baño.	67
Tabla 12. Aminoácidos libres (mg Leucina/mL de leche) en los sistemas inoculados con <i>Lacococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y tratados con US de baño.	73
Tabla 13. Análisis de varianza de contenido de aminoácidos libres (mg Leucina/mL de leche) en los sistemas de leche, inoculados con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y sonicados con US de baño.	74
Tabla 14. Aminoácidos libres (mg Leucina/mL de leche) en los sistemas inoculados con <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> y tratados con US de sonda.	75

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son de gran importancia para los seres humanos debido a los beneficios sobre la salud que se les atribuyen. Las BAL tienen diversas aplicaciones en productos lácteos, ya que confieren características sensoriales únicas al producto, atribuibles en gran medida a la fermentación de leche que llevan a cabo. Sin embargo, este proceso puede ser prolongado, y en consecuencia no siempre resulta fácil su implementación industrial; por tanto, se han explorado distintos pretratamientos de leche que pueden acelerar la fermentación de leche empleando BAL selectas. Recientemente se ha reportado al ultrasonido de potencia (USP) como una tecnología emergente que facilita la fermentación de productos lácteos; su aplicación consiste en ondas sónicas de baja frecuencia (20-100 kHz) que inducen el efecto conocido como cavitación, el cual es responsable de producir cambios microestructurales en leche, que pueden alterar sus propiedades tecnológico-funcionales.

En este trabajo se estudió el efecto del USP en leche bovina adicionada con bacterias ácido lácticas aisladas de un producto fermentado artesanal. En una primera etapa se llevó a cabo la identificación, cinética de crecimiento y perfil fermentativo de BAL aisladas de queso adobera. La identificación se realizó mediante secuenciación del gen 16S rDNA empleando la técnica de PCR mientras que la cinética de crecimiento se determinó por crecimiento de BAL en caldo MRS (cada 4 h durante 36 h) y conteo en agar MRS; asimismo, para el perfil fermentativo se evaluaron cambios en pH y acidez. La segunda etapa consistió en la aplicación de USP con dos tipos de dispositivo ultrasónico (baño y sonda) sobre sistemas de leche inoculados con una BAL aislada del queso y preseleccionada de acuerdo a su potencial fermentativo, determinando posibles cambios en el comportamiento microbiano y parámetros asociados de acidificación. Por último, se analizó el efecto del USP sobre los componentes de leche (aminoácidos libres y morfología del glóbulo de la grasa) estandarizada a diferentes proporciones de grasa como medidas de su potencial como pretratamiento para favorecer la producción de compuestos de flavor relevantes en productos fermentados.

Los resultados de la primera etapa mostraron que se aislaron 21 BAL, de las cuales se trabajó únicamente con 6; éstas fueron identificadas como *Enterococcus faecium* (5) y *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (1). Las curvas de crecimiento mostraron un

crecimiento exponencial de todas las cepas a partir de las 4 h de incubación; sin embargo, no existió diferencia significativa ($p < 0.05$) en los parámetros de velocidad de crecimiento ni tiempo de duplicación, por lo que se seleccionó una cepa que creciera a 37°C , la cual fue la única presente de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Condiciones selectas de ultrasonido indujeron cambios en el comportamiento fermentativo de la bacteria seleccionada. Para la aplicación del USP, los resultados mostraron que un tratamiento de 90 min en baño ultrasónico aumentó la población bacteriana y porcentaje de ácido láctico en leche parcialmente descremada inoculada con *L. lactis* subsp. *lactis* al ser tratada durante 90 min; por su parte, al aplicar USP de sonda, *L. lactis* subsp. *lactis* mostró un cambio significativo ($p < 0.05$) en su crecimiento y acidificación con una amplitud de 90% y tiempo de tratamiento de 1 min y en leche parcialmente descremada. Respecto al efecto del USP en los componentes de la leche inoculada con *L. lactis* subsp. *lactis*, el glóbulo graso fue afectado por ambos tratamientos de USP (baño y sonda), debido a que provocaron una reducción del tamaño del glóbulo de grasa. Por último, el contenido de aminoácidos libres tuvo un cambio significativo ($p < 0.05$), indicando que el tipo de leche y tiempos de sonicación influyeron en el potencial proteolítico de la cepa, con un consecuente incremento en el contenido de aminoácidos libres, probablemente relacionado con el desdoblamiento proteico inducido por el tratamiento ultrasónico. Por lo tanto, la aplicación de US de potencia a sistemas de leche inoculados con *L. lactis* subsp. *lactis* favorece el crecimiento de microorganismos benéficos e influye sobre su perfil fermentativo, logrando disminuir el tiempo de fermentación; además de favorecer cambios microestructurales en leche que pueden modificar el perfil de sabor del producto tratado.

ABSTRACT

Due to both their attributed nutritional and nutraceutical benefits lactic acid bacteria (LAB) are of great importance for human beings. LAB have several applications in dairy technology as they confer unique sensory characteristics to fermented products. However, this process may take time and, consequently, industrial applications might be somehow limited; thus, different milk pretreatments aimed at reducing fermentation times have been explored and tested with selected LABs. Recently, power ultrasound (USP) has been reported as an emerging technology that may help dairy fermentation processes. Its application consists on the application of low frequency sonic waves (20-100 kHz) causing the effect known as cavitation, which is the responsible for producing microstructural changes in milk that may alter their technological properties.

The aim on this work was to study the effect of power ultrasound in bovine milk added with lactic acid bacteria. In a first stage, the identification, growth kinetics and fermentative profile of LAB isolated from adobera, a slightly ripened artisanal cheese, were carried out. The identification was made by sequencing 16S rDNA gene using the PCR technique while growth kinetics was determined by growing LAB in MRS broth (followed every 4 h through 36 h) while count was performed in MRS agar. Meanwhile, pH and the acidity changes were evaluated for obtaining LAB fermentative profile. The second stage consisted in the application of USP using two devices (an ultrasonic water bath and an ultrasonic device with titanium probe) in milk systems inoculated with one of the isolated cheese LAB and selected for its fermentative potential, determining their effect on the microbial behavior and acidification parameters. Finally, the effect of USP on selected components (free amino acids and milk fat globule morphology) of milk standardized at different fat contents milk was analyzed, evaluating its potential as a pretreatment for improving compounds relevant for flavor development in fermented dairy foods.

Twenty-one different LABs were isolated, while only 6 of them were studied, all of them from the *Enterococcus faecium* (5) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (1) species. Fermentation curves showed an exponential growth of all the strains after a 4 h-incubation. However, no significant difference ($p < 0.05$) in growth rate parameters was found; thus, a single strain capable of growing at 37 °C (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) was chosen and used in all the remaining work.

Selected USP treatments induced changes in the fermentative behavior of selected bacterial strain. The results showed that a 90-min USP bath treatment increased the population and titrable acidity (expressed as % lactic acid) in partially skimmed milk inoculated with *L. lactis* subsp. *lactis*; meanwhile, when applying USP with a probe, *L. lactis* subsp. *lactis* showed a significant change ($p < 0.05$) in growth and acidification pattern with a 1-min, 90% amplitude treatment in partially skimmed milk. Regarding the effect of USP on components of milk inoculated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, milk fat globule was affected by both USP treatments (bath and probe) since a noticeable reduction in fat globule size was observed. Finally, a significant change ($p < 0.05$) in free amino acid content was observed indicating that both milk type and sonication times influenced the content of free amino acids, probably related to a slight USP-related protein unfolding. Therefore, the application of power US to milk systems inoculated with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* favored the growth of beneficial microorganisms and influenced their fermentative profile, reducing the fermentation time; besides, USP might favor microstructural changes in milk components that may modify the flavor profile of such product.

INTRODUCCIÓN

Las tendencias alimentarias por parte de los consumidores han hecho que en la actualidad se desarrollen más y nuevos productos; dentro de estos se encuentran los alimentos funcionales, los cuales proporcionan beneficios extras a la salud de los consumidores (Kazeem y Davies, 2016). Algunos de los ingredientes que contienen son las vitaminas y minerales, ácidos grasos, antioxidantes, bacterias ácido lácticas, entre otros (De Boer *et al.*, 2016); sin embargo, para mantener estos ingredientes es necesario utilizar tratamientos menos severos, como las tecnologías no térmicas las cuales tienen menor afectación de estos componentes (Fernández-Molina *et al.*, 2001). Dentro de estas tecnologías podemos mencionar al ultrasonido de potencia, cuyo principio es la aplicación de ondas sónicas que se propagan en un medio líquido de forma longitudinal (Knorr *et al.*, 2004); esta onda crea ciclos de compresión y expansión alternos creando así pequeñas burbujas que se expanden y contraen simultáneamente, esta formación y evolución del tamaño de las burbujas se conoce como cavitación (Condón *et al.*, 2005).

La aplicación del ultrasonido en los alimentos ha sido utilizada recientemente de manera particular en la industria de los lácteos, donde se han mostrado cambios durante el procesamiento, uno de estos es la homogenización provocando el rompimiento de los glóbulos de grasa, lo que mejora las características de viscosidad de la leche; otro efecto importante es que el ultrasonido provoca la inactivación de enzimas y microorganismos patógenos, produciendo daños en la pared celular (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012), sin embargo, en los últimos años la aplicación de ultrasonido se ha extendido más allá de la inactivación de microorganismos, se ha demostrado su capacidad para estimular el crecimiento de microorganismos benéficos para la producción de ciertos productos lácteos, al mismo tiempo que disminuye los tiempos de fermentación (Yang *et al.*, 2008; Ojha *et al.*, 2017). Lo que indica que el ultrasonido es una tecnología prometedora que puede ser aplicada en la industria de la fermentación (Lanchun *et al.*, 2003).

Por otro lado, el estudio de productos lácteos elaborados artesanalmente como lo es el queso adobera, son desde hace un tiempo objeto de estudio, debido a que contienen bacterias ácido lácteas que otorgan características sensoriales al producto, la

existencia de estos microorganismos resulta benéfico tanto para el alimento como para los consumidores debido a que proporcionan una gran variedad de efectos a nivel gastrointestinal (Carr *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2009). Es por esto, que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de procesos asistidos con ultrasonido de potencia (baño y sonda) sobre el perfil fermentativo y tasa de crecimiento de bacterias ácido lácticas adicionadas en leche con diferentes contenidos de grasa, además de estudiar el efecto de esta tecnología sobre componentes de la leche.

HIPÓTESIS

La aplicación de procesos asistidos con ultrasonido de potencia en leche bovina adiciona con bacterias ácido lácticas permitirá reducir tiempos de fermentación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de procesos asistidos con ultrasonido de potencia sobre el perfil fermentativo, tasa de crecimiento de bacterias ácido lácticas adicionadas en leche con diferentes contenidos de grasa.

Objetivos particulares

- Aislar e identificar bacterias ácido lácticas presentes en un producto comercial elaborado de manera artesanal.
- Realizar cinéticas de crecimiento y parámetros de fermentación de bacterias ácido lácticas aisladas.
- Evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonido de potencia (de sonda y baño) sobre tiempos de fermentación y tasas de crecimiento de una bacteria ácido láctica inoculada en leche con diferentes contenidos de grasa.
- Determinar la influencia del ultrasonido de potencia (de sonda y baño) sobre los componentes de leche con diferentes contenidos de grasa.

MARCO TEÓRICO

1. Leche

1.1. Definición

La leche se define como la secreción de las glándulas mamarias de los mamíferos destinada como alimento para sus crías, entre las especies domésticas existen algunas especializadas en la producción de leche para consumo humano, tal como la leche bovina (Adib y Bertrand, 2009). La leche es un alimento común en todo el mundo con alta demanda comercial, independientemente del origen, añade un importante contenido proteico a la dieta humana; su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales, además es fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuye significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina).

Por otra parte, contiene lípidos y lactosa, los cuales constituyen un importante aporte energético (Agudelo y Bedoya, 2005), así mismo, posee ciertas características sensoriales y microbiológicas importantes para el consumidor (Bermúdez-Aguirre y Barbosa-Cánovas, 2008).

La definición física, señala que la leche es un líquido de color blanco opalescente característico, este color se debe a la refracción que sufren los rayos luminosos que inciden en ella al chocar con los coloidales en suspensión (Agudelo y Bedoya, 2005).

1.2. Composición química de la leche

La leche es una mezcla compleja de distintas sustancias presentes en forma de suspensión o emulsión (Agudelo y Bedoya, 2005). Químicamente, la leche es uno de los fluidos más completos que existen, contiene varios grupos de nutrientes, las sustancias orgánicas están presentes en cantidades casi iguales y se dividen en proteínas, carbohidratos y lípidos. Contiene también trazas de elementos como vitaminas, enzimas y sales disueltas, especialmente en forma de fosfatos, nitratos, cloruro de calcio, magnesio, potasio y sodio (Guetouache *et al.*, 2014). En la Tabla 1 se presenta la composición general de la leche de vaca.

Tabla 1. Composición general de la leche de vaca (por cada 100 g).

Nutriente	Contenido del nutriente (g)
Agua	88
Energía (Kcal)	61
Proteína	3.2
Grasa	3.4
Lactosa	4.7
Minerales	0.72

Tomado de Agudelo y Bedoya, 2005.

1.2.1. Agua

El contenido de agua en la leche de diferentes especies de mamíferos puede variar del 36 al 90.5%, sin embargo, normalmente representa el 87-88% del contenido total de la leche, esta variación se debe a la alteración de cualquiera de sus otros componentes: proteínas, lactosa y sobre todo, grasa. Por su importante contenido de agua, la leche permite que la distribución de sus componentes sea relativamente uniforme y de esta forma cualquier cantidad de leche, por pequeña que sea, contiene casi todos los nutrimentos disponibles (Guétouache *et al.*, 2014).

1.2.2. Proteína

La proteína contenida en la leche de vaca es del 3.5%, variando desde el 2.9 al 3.9%, esta proteína láctea es una mezcla de numerosas fracciones proteicas diferentes (Figura 1) y de pesos moleculares distintos. Las proteínas se clasifican en: caseínas que son las más abundantes (78%); suero o proteínas de suero de leche (17%); y la fracción de nitrógeno no proteico (5%) (Dupont *et al.*, 2011).

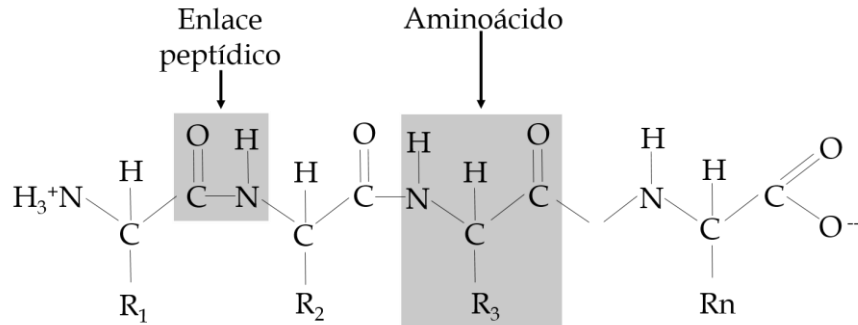


Figura 1. Estructura general de las proteínas lácteas.

Tomado de Agudelo y Bedoya, 2005.

1.2.2.1 Caseína

La caseína es la proteína más abundante en la leche, además de ser única, por no encontrarse en otros alimentos; existen cuatro tipos de caseínas (α_{s1} , α_{s2} , β - y κ -), se encuentran presentes en forma de partículas esféricas con un diámetro medio de 150 nm y una masa molecular de 20-25 kDa, estas partículas se conocen como micelas de caseína, generalmente la κ -caseína se encuentra cerca de la superficie externa de la micela, sin embargo, todas se distribuyen uniformemente dentro de esta como se observa en la Figura 2. En general, las caseínas presentan estructura primaria ya que es poco común que tengan estructura secundaria y terciaria, lo que le confiere gran flexibilidad y una estructura fácilmente desnaturizable por agentes como el calor o la urea y a la acción de las enzimas. Una de las características importantes de las caseínas es su capacidad para formar espumas y emulsiones ya que son solubles en pH neutros (Farrell, 2011). El comportamiento de los diferentes tipos de caseína en la leche al ser tratada con calor, pH y diferentes concentraciones de sal, provee las características de productos derivados como los quesos, los productos de leche fermentada y las diferentes formas y presentaciones de la leche (Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz, 2014).

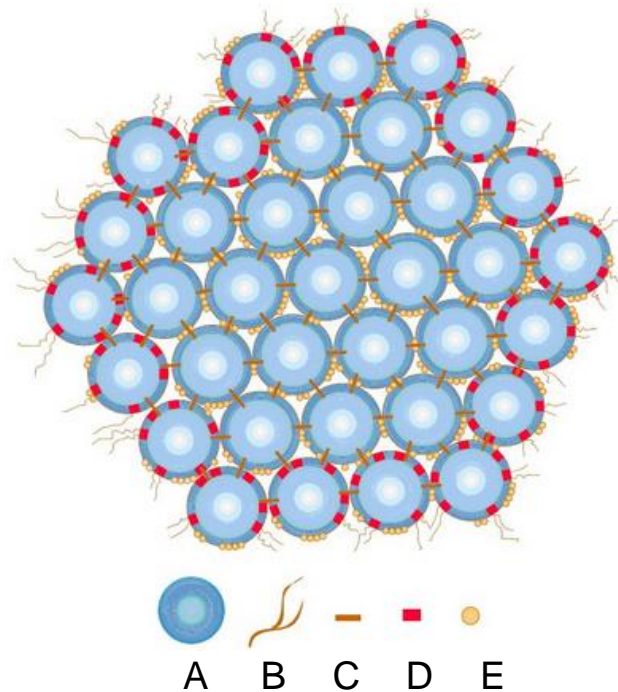


Figura 2. Estructura de la micela de caseína propuesta por Walstra y Jenness en 1984, A: sub-micela, B: cadena sobresaliente, C: fosfato de calcio, D: κ -caseína, E: grupos fosfatos.

La fracción α_{s1} es la mayoritaria en las micelas de caseína, está compuesta por 199 aminoácidos, de los cuales ocho son residuos de la serina fosforilados en las cadenas laterales y posee una masa molecular de 23.62 kDa. En cuanto a su estructura, está formada por un dominio hidrofóbico en el extremo carboxi terminal (100-199), compuesto mayoritariamente por estructura beta y por un dominio hidrofílico en el extremo amino terminal (1-99). Además, precipita en presencia de iones calcio (Schlimme y Buchheim, 2002).

La fracción α_{s2} está formada por 207 aminoácidos y una masa molecular de 25.23 kDa, tiene un puente disulfuro entre las cisteínas que ocupan las posiciones 36 y 40 de la secuencia y es más hidrofílica que la α_{s1} . Al igual que la anterior, precipita en presencia de iones Ca^{2+} (De Kruif, 2003).

La fracción β está compuesta de 209 aminoácidos, de los que 35 son residuos de la prolina distribuidos uniformemente en la molécula, además, contiene 5 fosfoserinas

en el extremo N-terminal y ninguna cisteína. Es la caseína más anfipática de todas, con un extremo C-terminal fuertemente hidrofóbico (Schlimme y Buchheim, 2002).

La fracción κ está compuesta por 169 aminoácidos y una masa molecular de 19 kDa, en su estructura tiene 2 cisteínas y entre 3 a 6 moléculas de galactosa; está muy poco fosforilada, teniendo solamente un grupo de fosfato, esto hace que interaccione con el ion calcio mucho menos que las otras caseínas, sin embargo, comparte con la β la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta fracción se rompe fácilmente por proteólisis en el enlace situado entre la fenilalanina 105 y la metionina 106, cuando esta proteólisis se produce, el fragmento N-terminal 1-105 queda unido a las otras caseínas en la micela. La ruptura de la κ produce la desestabilización de la micela y a temperaturas por encima de 20 °C su segregación, este proceso es el que se produce en la fabricación de la gran mayoría de los quesos (Fox y Brodkord, 2008).

1.2.2.2 Factores que afectan a la estabilidad de la micela de caseína

Las micelas de caseína no se pueden considerar estructuras estables, se modifican por varios factores (Fox y Kelly, 2004), algunos ejemplos son los siguientes:

- El almacenamiento de la leche cruda en frío durante un tiempo prolongado influye especialmente en la fracción β debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas, se disocia la micela, sin embargo, esto puede revertirse parcialmente si se recalienta ligeramente la leche.
- Al calentar la leche a temperaturas superiores a 70 °C se produce una agregación creciente de las proteínas de suero, creando complejos de caseína-proteína de suero que confieren en las micelas propiedades diferentes, por ejemplo, en la coagulación, esto se produce por acidificación o por hidrólisis enzimática.
- La baja de pH en la leche produce la solubilización del fosfato de calcio coloidal y por debajo de pH 5.2 las micelas empiezan a formar agregados que precipitan en su punto isoeléctrico (pH 4.6), estos agregados se vuelven a disolver cuando el pH sube a la neutralidad, aunque las micelas no vuelven a su estado natural.
- El tratamiento de las micelas de caseína a elevadas presiones hidrostáticas como, por ejemplo, 200 MPa, 5 min a 20 °C, produce su descomposición en subunidades o pequeños agregados.

1.2.2.3 Proteínas de suero

Las proteínas de suero se encuentran presentes en la fracción soluble de la leche y se componen principalmente de α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, albúmina de suero e inmunoglobulinas.

La mitad de la proteína de suero se representa con la β -lactoglobulina (50% de la fracción proteica del lactosuero) con una masa molecular de 18.3 kDa, su estructura consta de 162 aminoácidos; la α -lactoalbumina representa el 25% de las proteínas de suero, con una masa molecular de 14.2 kDa y es una molécula de 123 aminoácidos, esta juega un papel muy importante en la síntesis de la lactosa, ya que es el modificador en el complejo de la lactosa sintetasa (Chartterton *et al.*, 2006; Ng-Kwai-Hang, 2011); la albúmina de suero tiene una masa molecular de 65-67 kDa, sin embargo, estas se desnaturalizan con facilidad al calentarlas (Ahmad y Ahmad, 2017); las inmunoglobulinas representan al menos el 2% del total de las proteínas de la leche (Ng-Kwai-Hang, 2011).

1.2.3. Grasa

La grasa láctea se sintetiza en su inmensa mayoría en las células secretoras de la glándula mamaria y constituye cerca del 3% de la leche; se encuentra en forma de partículas emulsionadas o suspendidas en pequeños glóbulos microscópicos, cuyos diámetros pueden variar de 0.1 a 0.22 micrones, los cuales se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos, esfingolípidos y gangliócidos que evitan que la grasa se aglutine y pueda separarse de la parte acuosa como se muestra en la Figura 3. La grasa de la leche puede sufrir alteraciones causadas por la acción de la luz, el oxígeno y enzimas (lipasas). Los procesos hidrolíticos oxidativos conducen a la formación de peróxidos, aldehídos, cetonas y ácidos grasos libres, originándose así alteraciones del sabor que se hace sebáceo o rancio (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014).

El ácido butírico es una de las causas del sabor rancio en la leche, las lipasas producen la liberación de este ácido, sin embargo, se inactiva con la pasteurización lenta a bajas temperaturas. Por otro lado, esta enzima puede producirse por bacterias como *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus* (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014).

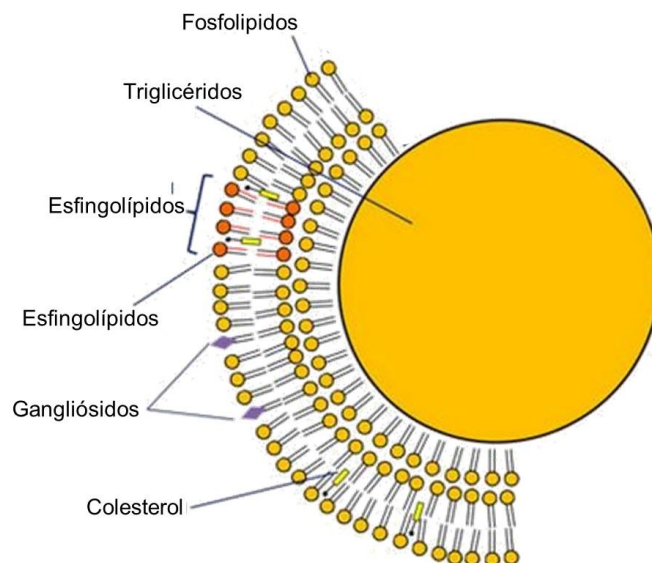


Figura 3. Estructura general del glóbulo de grasa de la leche.

Tomado de Luo *et al.*, 2014.

La composición lipídica de la leche incluye dos grupos principales: lípidos simples y lípidos complejos. Los lípidos simples se componen principalmente de glicéridos y en pequeñas cantidades de esteroides y cerebrosidos. Los glicéridos se conforman de triglicéridos (98%), diglicéridos (0.2-1.5%) y monoglicéridos (trazas) y los ácidos grasos de estos representan casi el 90% de la grasa, se encuentran tanto en cadenas largas como en cadenas cortas. Por otro lado, los lípidos complejos se componen de fósforo y/o nitrógeno. Los más importantes son los fosfolípidos, que representan solo el 1% de grasa, pero actúan como estabilizador de las emulsiones, sus características hidrófilas y lipófilas les permiten formar puentes entre las fases acuosa y grasa, este tipo de lípidos los encontramos en la crema (60% aproximadamente) y la mantequilla (40%).

Existen tres fosfolípidos principales: lecitina, cefalina y esfingomielina; el 85% de los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos son de cadena larga, otros lípidos complejos presentes en cantidades menores son gangliósidos, glicolípidos y glucoesfingolípidos (Guetouache *et al.*, 2014).

1.2.4. Carbohidratos

La lactosa es el carbohidrato principal de la leche, está formada por la unión de una molécula D-galactosa y una D-glucosa, consta de un enlace β -galactosido y un 4-D-glucopiranosil- β -D-galactopiranososa (Figura 4). Aunque la lactosa es un azúcar, no tiene sabor dulce, su concentración es de aproximadamente 4.5 g/ 100 mL; se utiliza como sustrato durante la fermentación de la leche por ciertas bacterias (Fillion, 2006; Guetouache *et al.*, 2014).

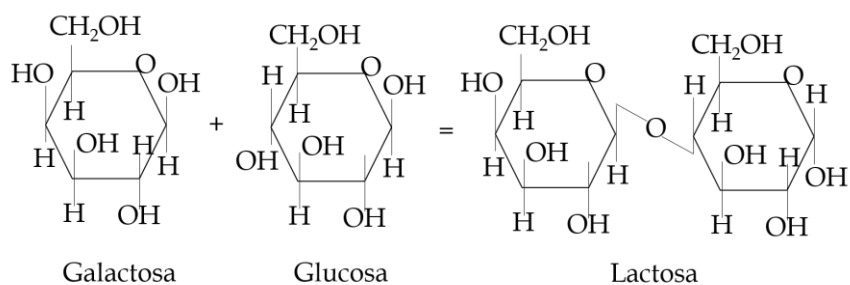


Figura 4. Estructura de la lactosa.

Tomado de Agudelo y Bedoya, 2005.

Algunos microorganismos transforman la lactosa en ácido láctico, de este modo provocan la fermentación láctica, que trae como consecuencia la coagulación de la leche. En la fermentación de la lactosa además del ácido láctico se producen algunos compuestos aromáticos y volátiles como el acetyl metil carbinol y el diacetilo; el ácido láctico que a su vez puede ser transformado por algunas bacterias a ácido acético y CO_2 (Ohlsson *et al.*, 2017). Las sustancias volátiles que se producen en la fermentación le imparten el olor agrio a la leche. El ácido láctico puede también transformarse en ácido butírico por acción de bacterias anaerobias esporuladas como es el *Clostridium butyricum* que causa la hinchazón tardía del queso (Guetouache *et al.*, 2014).

1.2.5. Vitaminas y minerales

En la leche encontramos diversas vitaminas, las más representativas son las vitaminas A, D y E, estas son variables dependiendo de la estación del año, ya que hay un ligero aumento durante la temporada de pasteo (primavera-verano). Estas vitaminas son solubles en grasa, sin embargo, se pueden perder durante el descremado de la

leche; otras vitaminas son solubles en agua y se encuentran en el suero de la leche, tal es el caso de la vitamina C, que está presente en pequeñas cantidades y se destruye por contacto con el aire y también durante la pasteurización (Florence, 2010).

Los minerales juegan un papel importante en la organización estructural de las micelas de caseína ya que se encuentran dentro de su composición, los principales minerales presentes en la leche son sodio (445 ppm), magnesio (105 ppm), fósforo (896 ppm), potasio (1500 ppm), calcio (1180 ppm), entre otros (Amiot *et al.*, 2002; Guetouache *et al.*, 2014).

1.2.6. Enzimas

Las enzimas son proteínas globulares específicas producidas por células vivas, cada enzima tiene su punto isoeléctrico y es susceptible a diversos agentes desnaturizantes tales como los disolventes orgánicos, pH y temperatura. Existen dos grupos de enzimas, las hidrolasas cuyo mecanismo de acción se caracteriza por un desdoblamiento hidrolítico, a este grupo pertenecen entre otras, las esterasas, lipasas, proteasas, fosfatasa alcalina (Agudelo y Bedoya, 2005).

Entre las enzimas mencionadas, la lipasa produce la hidrólisis de la grasa descomponiendo los glicéridos en glicerol y ácidos grasos, la lipasa nativa de la leche es termosensible y se inactiva con la pasteurización lenta a bajas temperaturas, pero la lipasa que producen las bacterias como las *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Bacillus*, principalmente, son termorresistentes y solo se inactivaran sometiendo a la leche a altas temperaturas. Por otro lado, la fosfatasa alcalina es la de mayor importancia por su sensibilidad al calor, esta es una metaloproteína que contiene en su molécula Zinc y está ligada a la materia grasa; la resistencia al calor de esta enzima es un poco superior a la de las bacterias patógenas que pueden existir en la leche, por lo que se usa en la industria para el control de la pasteurización de la leche, ya que cuando la fosfatasa se destruye lo hacen también las bacterias patógenas (Faría *et al.*, 2000).

El otro grupo importante de enzimas son las oxidoreductasas, dentro de estas se encuentra la catalasa y peroxidasa que sirven como indicadoras de la calidad microbiológica de la leche (Agudelo y Bedoya, 2005).

1.2.7. Procesos que afectan la composición química de la leche

Es importante hacer mención de algunos procesos que pueden afectar la composición y calidad de la leche durante su producción o almacenamiento, dentro de estos procesos podemos encontrar:

- Oxidación de lípidos: Produce la oxidación de ácidos grasos y genera compuestos que afectan la calidad de la leche, debido a que ocasiona cambios en el color, sabor, textura y un deterioro en la calidad de la grasa. La oxidación lipídica está influenciada por una serie de parámetros que incluyen la exposición a la luz, temperatura, presencia de compuestos antioxidantes y el grado de insaturación de la grasa. Los productos aromáticos volátiles de la oxidación de lípidos incluyen aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres e hidrocarburos, de los cuales los aldehídos y cetonas son los principales responsables de sabores rancios (Fuquay *et al.*, 2011).
- Proteólisis: Es la degradación de las proteínas en compuestos de menor peso molecular, péptidos y aminoácidos (O'Mahony *et al.*, 2005). En la leche tiene dos orígenes, el primero mediante microorganismos que pueden secretar proteasas exógenas resistentes al calor y muchas de ellas se desarrollan durante el almacenamiento en frío de la leche (Fairbairn y Law, 1986), el segundo está relacionado con el deterioro de la ubre enferma lo que incrementa la cantidad de proteasas endógenas, especialmente aquellas del sistema plasmina-plasminógeno (Le Roux *et al.*, 1995). Las caseínas de la leche están sometidas a la acción de las proteasas, las cuales causan desestabilización de las micelas de caseínas, hidrolizando más rápidamente a la κ -caseína. La β -caseína es degradada en menor proporción que las κ -caseína y las α_{s1} y α_{s2} prácticamente no sufren alteración (Fox *et al.*, 2000). La proteólisis puede causar principalmente una disminución en el rendimiento del queso y un deterioro en la composición y calidad del mismo, además de producir sabor amargo en los productos lácteos procesados (Guerrero *et al.*, 2003).
- Lipólisis: Es la hidrólisis que sufren los lípidos presentes en la leche, catalizada por la enzima lipasa, dando como resultado la producción de ácidos grasos

libres y triglicéridos que finalmente contribuyen a los defectos del sabor. La lipasa hidroliza los ésteres a partir de glicéridos emulsionados en una interface aceite-agua. Generalmente la lipólisis se puede clasificar en dos categorías, la espontánea y la inducida, la primera es cuando se produce en la leche después de enfriarla por debajo de 15 °C poco después del ordeño, aunque también se relaciona con la etapa de la lactancia de la vaca, ya que cuando ésta se encuentra en lactancia tardía es más susceptible a producir leche con una lipólisis espontánea. Por otra parte, la lipólisis inducida es cuando la lipasa es activada por medios físicos, térmicos o químicos; como, por ejemplo, cuando la leche se somete a una secuencia de cambios de temperatura brusca. Otro de los factores que pueden producir la lipólisis es la contaminación de ésta con microorganismos psicrotóxicos generalmente Gram negativos (Ray *et al.*, 2013).

1.3. Propiedades fisicoquímicas de la leche

Algunas de las propiedades de la leche dependen de sus constituyentes, de las sustancias en solución y de los iones o de los electrones, dentro de estas se encuentran a las siguientes propiedades:

- **Densidad:** es la relación que existe entre el peso y el volumen de la leche, es un valor que varía con la temperatura y depende de dos factores, de la concentración de elementos disueltos y en suspensión (la densidad aumenta cuando el contenido de sólidos aumenta) y de la cantidad de grasa (la densidad disminuye cuando el contenido de grasa aumenta), es decir: la leche descremada tiene mayor densidad, mientras que la adición de agua a la leche hace que la densidad disminuya. Los valores medios pueden estar entre 1.030 y 1.033 g/mL a 20 °C (Alais, 2000).
- **pH:** es la medida de la cantidad total de iones H⁺ disociados en el líquido, está en promedio entre 6.6 y 6.8 a 20 °C en la leche, la leche puede tener el mismo grado de frescura, sin embargo, presentar un diferente grado de acidez (Miller, 2007).
- **Acidez:** es la transformación de la lactosa por acción microbiana en ácido láctico, la leche generalmente tiene una acidez de 1.3 a 1.7 g/L expresada en ácido

láctico. La acidez normal de la leche se debe principalmente a su contenido de caseína (0.05-0.08 %) y de fosfatos (Miller, 2007).

- Viscosidad: es la resistencia de los líquidos al flujo. Ésta disminuye con el aumento de temperatura; además aumenta cuando el pH de la leche disminuye debajo de 6.0. La viscosidad depende también de la composición, la leche es mucho más viscosa que el agua debido sobre todo a los glóbulos de grasa y las macromoléculas; así cualquier modificación en el porcentaje de grasa y/o proteínas se refleja en un cambio de viscosidad. A 10 °C la leche entera tiene 2.8 centipoise y la leche descremada tiene 2.5 centipoise (Miller, 2007).

1.4. Tipos de leche

Es importante tener presente que cuando se trabaja con leche para su industrialización y comercialización debe cumplir con ciertos requisitos básicos. En el caso de la leche de vaca y con base a lo estipulado en la NOM-243-SSA1-2010, se debe asegurar un contenido específico y constante de nutrimentos. En cuanto al contenido de grasa, el proceso de estandarización permite ajustar el porcentaje de grasa de acuerdo con las especificaciones de la leche entera, parcialmente descremada y descremada.

1.4.1. Leche entera

Es el producto que una vez extraído por medio del ordeño y pasteurizado puede o no someterse a estandarización, agregando o extrayendo grasa, ya que en general la leche contiene entre un 2.2% y un 3.8% de grasa (García-Garibay y López, 2004).

1.4.2. Leche descremada y parcialmente descremada

Son productos fabricados a partir de la reducción del contenido de grasa de la leche entera, ya sea de forma total o parcial a través de un proceso físico de separación que depende de la diferencia de densidades entre los glóbulos de grasa y la fase acuosa en la que están dispersos. Dicha separación puede hacerse por sedimentación, con centrifugación o bombas centrípetas. Posteriormente, los productos con reducido contenido de grasa se someten a un proceso de estandarización y restauración o adición de nutrimentos con el fin de recuperar las vitaminas liposolubles y minerales perdidos, y ajustar el contenido de grasa a menos del 0.5% o entre 0.6% y 2.8%, según sea leche

descremada o parcialmente descremada y así adecuarse a la normatividad. En México la leche que contiene entre 16 y 18 g/L de grasa butírica puede ser denominada leche semidescremada o parcialmente descremada (García-Garibay y López, 2004).

1.5. Productos lácteos

Estos productos pueden ser elaborados a partir de la leche entera, parcialmente descremada y descremada, por lo que en algunos casos se emplean emulsificantes, estabilizantes o espesantes para restituir o añadir consistencia, manteniendo las características sensoriales y nutricionales del producto (NMX-F-444-1983), a continuación, se describen algunos productos lácteos.

- Lácteos fermentados: son productos obtenidos de la fermentación de leche mediante la acción de microorganismos. Como resultado de este proceso se da la reducción de los valores de pH, se suele o no presentar coagulación, lo que contribuye a inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos y por lo tanto, confiere inocuidad al producto (NMX-F-444-1983; Ramírez-López y Vélez-Ruíz, 2012).
- Crema: es el producto en el que se ha reunido una fracción determinada de grasa y sólidos no grasos de la leche, existen diferentes denominaciones que dependen principalmente del contenido de grasa butírica, por ejemplo, crema extra grasa (35%), crema (30%), media crema (20%) y crema ligera (14%). Existen otros tipos como la crema fermentada o acidificada y la crema vegetal, que se obtienen de emulsiones de grasas o aceites vegetales comestibles en leche (NOM-243-SSA1-2010).
- Mantequilla: es el producto obtenido a partir de la grasa de la leche o la grasa de la crema al formar una emulsión w/o, que es pasteurizada para inhibir las lipasas, se somete a maduración, fermentación o acidificación, batido o amasado, adicionándole sal. Cuando se sustituye la grasa butírica de la mantequilla por grasa vegetal recibe el nombre de margarina (NOM-243-SSA1-2010).

- Queso: son productos elaborados de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca, con o sin adición de crema, obtenido de la coagulación de la caseína con cuajo, cultivos lácticos, enzimas apropiadas y con o sin tratamiento por calentamiento, dando lugar a diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso: fresco, artesanal, madurado o procesado (NOM-243-SSA1-2010).

1.5.1 Quesos artesanales

Los quesos artesanales se producen principalmente a partir de leche cruda, de acuerdo con su contenido de humedad se clasifican en suave, semiduro y duro, en términos de maduración, la mayoría no son madurados y pocos pueden estar semi-madurados o madurados. Dentro de las variedades representativas de quesos artesanales producidos en México se encuentran los siguientes: queso crema y bola de Ocosingo (Chiapas); queso guaje, cincho, hoja rueda y poro de balancan (Tabasco); queso Oaxaca (Oaxaca); Adobera, queso cotija y queso de morral (Jalisco), entre otros.

Algunas investigaciones reportan que los quesos artesanales pueden considerarse inseguros para el consumo humano, ya que se han asociado con diferentes enfermedades alimenticias, sin embargo, la mayor dificultad en torno a los quesos artesanales es la escasez de información, ya que sólo algunos de estos quesos se han caracterizado sistemáticamente (González-Córdova *et al.*, 2016).

1.5.1.1 Queso adobera

El queso adobera es elaborado de forma artesanal en el estado de Jalisco y en algunas regiones de Guanajuato, Michoacán, Querétaro e Hidalgo, es un queso fresco (de acuerdo con su contenido de humedad) (NOM-243-SSA1-2010); es rectangular, de color blanco a ligeramente amarillento, textura medianamente firme y de pasta granulada. En la mayoría de las ocasiones presenta una corteza fina asociada a un ligero añejamiento (el cual generalmente se realiza en un rango de 3 a 5 días). Se fabrica, con leche cruda de vaca de raza Holstein, por lo que la microflora nativa es la responsable de la acidificación del mismo (Cervantes *et al.*, 2008).

Uno de los principales problemas que enfrenta el queso adobera, es que, se elabora con leche cruda sin pasteurizar, proveniente de sistemas de lechería familiar,

donde, debido a la fuerte manipulación que sufre y a prácticas inadecuadas de higiene durante el ordeño, puede presentar altos conteos en bacterias; lo que podría comprometer la calidad sanitaria e inocuidad del queso que se elabore (Ruvalcaba *et al.*, 2011), sin embargo, también contiene bacterias que son las que otorgan las características sensoriales de estos productos, dentro de estas bacterias encontramos a las bacterias ácido lácticas que se describen a continuación (González-Córdova *et al.*, 2016).

1.6. Bacterias ácido lácticas (BAL)

1.6.1. Características generales

Las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr *et al.*, 2002; Vázquez *et al.*, 2009). La mayoría de las BAL son mesófilas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5°C y otras a 45°C. Toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias, la mayoría crece a un pH entre 4 y 4.5 (Jay, 2000). Las funciones en la tecnología de productos alimenticios de las BAL son: formación de sabor ácido, inhibición de microorganismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas requerida para la formación de “ojos” en los quesos, proteólisis requerida en la maduración de los quesos (Hernández-Mendoza *et al.*, 2007) y también han sido muy utilizadas como probióticos (Hui, 1993; Hill *et al.*, 2002).

En la actualidad las bacterias lácticas son de gran importancia en los seres humanos, debido a los beneficios que se les atribuyen, pueden utilizarse tanto en la prevención como el control de ciertas enfermedades y son capaces de colonizar de forma natural grandes segmentos del tubo digestivo humano (Mandigan *et al.*, 2009). Dentro de las BAL hay dos géneros importantes: *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, esta última son consideradas benéficas debido a que producen vitamina K, lactasa y sustancias antimicrobianas como acidolina, lactocidina y bacteriocina, las cuales ayudan a combatir y prevenir infecciones en sus huéspedes, siendo los

microorganismos más utilizados como probióticos de consumo humano (Ried, 2004), además de esto, *Lactobacillus* permite la degradación de lactosa a ácido láctico, lo que se emplea en el mejoramiento y conservación de ciertos alimentos (Jiménez, 2009; Ramírez, 2010). Las bifidobacterias difieren del resto de bacterias ácido lácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación, además contribuyen de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones metabólicas protectoras, creando un efecto de barrera y el desplazamiento de microorganismos patógenos (Collado, 2005).

1.6.2. Clasificación de bacterias ácido lácticas

Las BAL pertenecen al phylum Firmicutes que comprenden alrededor de 20 géneros, siendo los siguientes los más representativos: *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* y *Weisella* (Parra, 2010). Las BAL se pueden clasificar según la fermentación de la lactosa en homofermentativas y heterofermentativas; el grupo homofermentativo compuesto de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* que poseen la enzima aldosa y producen ácido láctico como el producto final de la fermentación, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de lactosa en dos moles de ácido láctico, además que se produce más del 85% de ácido láctico a partir de la lactosa (Parra, 2010). Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfocetolasa (Hernández-Mendoza *et al.*, 2007). El grupo heterofermentativo producen solamente 50% de ácido láctico, éstas fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂ (Devlieghere *et al.*, 2004; Ly *et al.*, 2008). Este grupo está compuesto de los siguientes géneros: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* que convierten hexosas a pentosas (Ramírez *et al.*, 2011). Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfocetolasa, pero carece de la aldosa y hexosa isomerasa; así que, en lugar de seguir la vía Embden-Meyerhof-Parnas, utilizan las vías de la hexosa monofosfato (Parra, 2010).

1.6.3. Bacterias ácido lácticas aplicadas en alimentos

Las BAL constituyen un grupo de bacterias que se utilizan tradicionalmente para producir alimentos fermentados. Desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la calidad sensorial e higiénica de los productos fermentados. Por lo tanto, la confiabilidad de estas cepas iniciadoras, en términos de calidad y de propiedades funcionales es bastante alta, también son importantes en términos de rendimiento del producto a fermentar (Pascale *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta su papel en la producción de alimentos fermentados, las BAL pueden dividirse en dos grupos: BAL iniciadoras y BAL no iniciadoras (Steele *et al.*, 2013), dentro de las cuales encontramos a *Lactococcus spp.* que son fuertes acidificantes (Hussain *et al.*, 2009), mientras que *Lactobacillus spp.* son el género más utilizado para mejorar el sabor y la textura en diversos tipos de productos lácteos (Sahingil *et al.*, 2014).

1.6.4. *Lactococcus lactis* como cultivo iniciador

Lactococcus lactis se utiliza comúnmente como un cultivo iniciador para la fabricación de queso, yogurt y kéfir entre otros productos lácteos. La actividad metabólica de *Lactococcus lactis* determina el pH, la textura, el sabor y otras características sensoriales de los productos (Smit *et al.*, 2005). Los cultivos iniciadores están expuestos a diversos cambios fisicoquímicos a lo largo de la producción de alimentos, incluyendo estrés ácido, oxidativo y osmótico que afectan su actividad metabólica y, por tanto, pueden influir en la calidad de estos (Bachmann *et al.*, 2010).

Dentro de la clasificación de *Lactococcus lactis* encontramos dos subespecies importantes: *Lactococcus* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que la principal diferencia es que *L. lactis* subsp. *lactis* generalmente son fuertes y menos propensos a ser afectados por cambios en el medio ambiente, mientras que *L. lactis* subsp. *cremoris* generalmente son frágiles y sensibles a los cambios en el medio ambiente. Por ejemplo, *L. lactis* subsp. *lactis* pueden crecer a 40 °C, a pH de hasta 9.2, así como en presencia de NaCl al 4 %, mientras que *L. lactis* subsp. *cremoris* no pueden crecer bajo ninguna de estas condiciones (Kim *et al.*, 1999; Gallegos *et al.*, 2017).

1.6.4.1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y su aplicación en alimentos

Lactococcus lactis subsp. *lactis* (conocido anteriormente como *Streptococcus lactis*) es un microorganismo mesófilo, capaz de fermentar la lactosa produciendo ácido láctico en gran cantidad, de la misma forma es capaz de producir algunas sustancias antibacterianas produciendo bacteriocinas, entre las cuales destacan la nisina y la diplococcina (Davidson y Hoover, 1993; Kim *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2005). Es un cultivo iniciador en diversos productos fermentados, pero especialmente en productos lácteos, ha sido ampliamente utilizado en diversos productos como quesos madurados, suero de mantequilla madurado, cremas de leche maduradas y muchos otros (Mäyrä-Mäkinen y Bigret, 1993; Rodríguez *et al.*, 2005). Una característica importante de este microorganismo es que, puede ser utilizado como biopreservador, controlando el crecimiento de bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 e incluso algunas especies del género *Clostridium*, los cuales son responsables de serios problemas de conservación en diversos productos lácteos (Leroy *et al.*, 2002; Rodríguez *et al.*, 2005).

1.7 Tecnologías emergentes

1.7.1 Generalidades

En las últimas décadas, se ha despertado un creciente interés en las técnicas de conservación no térmicas capaces de inactivar microorganismos y enzimas presentes en los alimentos sin alterar sus características nutritivas, sensoriales y funcionales (Barbosa-Cánovas y Sepúlveda, 2004), estas tecnologías, además de mejorar la calidad de los alimentos, deben igualar o mejorar los niveles de seguridad de los tratamientos convencionales a los que quieren sustituir.

1.7.2 Clasificación

Dentro de la clasificación de tecnologías emergentes se encuentran los siguientes procesos: alta presión hidrostática, campos eléctricos pulsados, pulsos de luz, campos magnéticos oscilantes, luz ultravioleta, ultrasonido, entre otros. A continuación, se dará una breve descripción de cada proceso.

- Alta presión hidrostática: Es el proceso por el cual los alimentos son expuestos a altas presiones (100-1000 MPa) durante un tiempo reducido. La aplicación de la presión es instantánea y uniforme a través de la muestra, este tratamiento se basa en el principio de Le Chatelier de acuerdo al cual, cualquier reacción, cambio en conformación o cambio de fase acompañado por una disminución en volumen se ve favorecido a altas presiones. Este tratamiento tiene un efecto significativo sobre levaduras y bacterias, sin embargo, las esporas pueden presentar resistencia (Trujillo *et al.*, 2002).
- Campos eléctricos pulsados: Este proceso se basa en la aplicación de pulsos a alta intensidad de campo eléctrico (5-55 kV/cm) durante milisegundos. Se utiliza en el procesamiento de alimentos líquidos (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).
- Pulsos de luz: Este utiliza picos de energía de varios megavatios de potencia eléctrica que son disipados en la fuente de luz en tiempos de energización extremadamente pequeños (aproximadamente 1 microsegundo). La fuente de luz se ve sometida a campos eléctricos mucho más elevados de lo que sería posible en una tecnología continua convencional. El resultado es una potencia elevada durante el ciclo de trabajo, con un gasto moderado en el consumo de energía (Fernández-Molina *et al.*, 2001).
- Campos magnéticos: Existen diferentes tipos de campos magnéticos, estáticos u oscilatorios, los estáticos son aquellos cuya fuerza es constante con el tiempo, mientras que en un oscilante se aplica en forma de pulsos y pueden ser homogéneos o heterogéneos. Los campos homogéneos son aquellos cuya fuerza es constante en el espacio al cual se exponen las muestras; mientras que los campos heterogéneos son aquellos que presentan un gradiente que depende de la naturaleza del magneto (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010).
- Radiación con luz ultravioleta: La radiación ultravioleta se caracteriza por longitudes de onda muy cercanas a las de la luz del sol. Estas radiaciones se ubican en la región de energía del espectro entre 200 y 300 nm. La inactivación por luz ultravioleta se produce mediante la absorción directa de la energía ultravioleta por los microorganismos causando una modificación en sus componentes, alterando su reproducción genética (López-Díaz *et al.*, 2012).

- Ultrasonido: Este consta de ondas cuya frecuencia se transmite sobre el umbral del oído humano (aproximadamente 20 kHz) (Mason *et al.*, 2005). El ultrasonido (US) produce el efecto que es conocido como cavitación gaseosa, responsable de producir el efecto conservador, ya que de esta manera se promueve la implosión de micro burbujas las cuales generan la liberación de energía, esto permite aumentar de temperatura lo que provoca diferentes cambios físicos, químicos y bioquímicos de las células en ciertos productos procesados. Los US se clasifican en alta y baja intensidad, así como alta y baja frecuencia (Robles-Ozuna y Ochoa-Martínez, 2012).

1.7.3. Principio de funcionamiento del ultrasonido

La onda sónica que produce el US se propaga en un medio líquido de forma longitudinal, creando ciclos de compresión y expansión alternados, cuando la presión en el líquido creada por el ciclo de expansión alternativo, es lo suficientemente menor para superar las fuerzas intermoleculares (fuerza de tensión), se forman pequeñas burbujas, durante el subsecuente ciclo de expansión-compresión, las burbujas de gas se expanden y contraen simultáneamente, ésta formación y evolución del tamaño de burbujas se conocen como cavitación (Condón *et al.*, 2005), siendo influenciada por la frecuencia acústica, temperatura y presión aplicadas.

Las frecuencias más bajas generan burbujas más grandes y por lo tanto un colapso cavitacional más violento con mayor temperatura y presión, sin embargo, a medida que aumenta la frecuencia, existen más eventos de colapso por unidad de tiempo, y puede proporcionar un campo acústico más uniforme, aunque menos intenso; también se ha demostrado que las propiedades de los fluidos tales como la densidad y viscosidad, la presión de vapor del líquido y la presencia de tensoactivos afectan la extensión y la violencia de la cavitación (Ashokkumar *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2011).

La cavitación generada a partir de pequeñas burbujas se conoce como cavitación estable, ocasionando fuertes micro-corrientes en el medio líquido que actúan como ondas de choque (Cullen *et al.*, 2012); esta cavitación tiene lugar cuando las ondas ultrasónicas son de alta frecuencia y de baja amplitud en un rango de presión desde 1 a 100 kPa (Condón *et al.*, 2005). Por otro lado, se encuentra la cavitación transitoria que es

cuando las burbujas existen por periodos de tiempo muy cortos, a veces menores a un ciclo, y se caracterizan por colapsar violentamente (Cullen *et al.*, 2012). Cada evento de colapso puede considerarse como una implosión a micro-escala, se estima que se pueden generar temperaturas de 2000 a 5000 K y presiones de 300 a 1200 bar (Kazachek y Gordeychuk, 2009), sin embargo, el calor generado es transitorio, pues la energía se dispersa a los alrededores después de este colapso, por lo que el aumento de temperatura global en el medio es bajo (Sutkar y Gogate, 2009). Por otro lado, si se aplican temperaturas externas al fenómeno de cavitación, está comprobado que la presión de vapor puede llegar a amortiguar el efecto de la cavitación, disminuyendo la intensidad del colapso, por lo tanto, las burbujas causantes de la cavitación se forman más rápidamente, esto junto con un incremento en la presión de vapor y una disminución en la tensión superficial (Salleh-Mack y Roberts, 2007).

En la Figura 5 se muestra las modificaciones que sufren las burbujas de líquido durante la cavitación. La presión negativa durante el tratamiento causará un rompimiento en el medio líquido, provocando la formación de burbujas o cavitación.

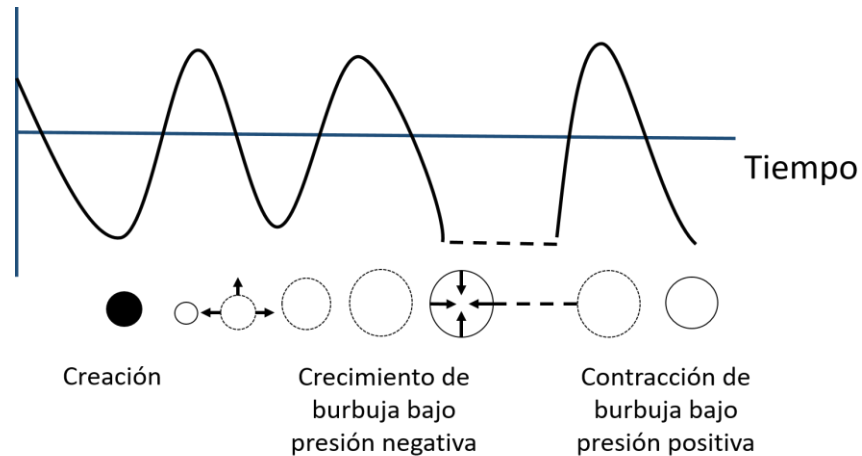


Figura 5. Proceso de cavitación generado durante la aplicación de ultrasonido.

Tomado de Zheng y Sun, 2006.

1.7.3.1. Clasificación del ultrasonido

El US puede clasificarse en ultrasonido de señal y potencia; las características más notables de cada uno se describen a continuación.

- Ultrasonido de señal o baja intensidad maneja frecuencias de 100 kHz a 1 MHz e intensidades por debajo de 1 W/cm², es utilizado para monitorear un proceso o producto. Ejemplos de aplicaciones en la industria alimentaria incluyen: medición del grosor de la cáscara de huevo, detección de agujeros en queso y papa, medición de estado de maduración en melón y aguacate, determinación de propiedades reológicas en queso, propiedades de textura en frutas como manzana, kiwi y melocotón y determinación de la vida útil en huevo y papa (Soria y Villamiel, 2010).
- Ultrasonido de potencia o alta intensidad con frecuencias de 18-100 kHz e intensidades mayores a 1 W/cm², consiste en señales de alta intensidad, se utiliza para modificar un proceso o producto (Mulet *et al.*, 1999), al emplear una frecuencia más baja y mayor potencia, produce cambios físicos y químicos. Para su funcionamiento, se requiere de un medio líquido, un generador de energía y un transductor, el cual convierte energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica (Mulet *et al.*, 2003).

1.7.3.2. Dispositivos ultrasónicos de potencia

Generalmente se emplean dos tipos de dispositivos ultrasónicos: sonda y baño ultrasónico. En la sonda ultrasónica se utiliza un solo transductor dentro de un cilindro de titanio (Figura 6a), lo que da como resultado un campo acústico intenso en el dispositivo, con una amplitud de vibración de aproximadamente 100 μm (Hunter *et al.*, 2008), éste puede tener una intensidad de energía muy alta, ya que el transductor está directamente en contacto con el medio líquido, esto provoca cambios durante el procesamiento de productos alimenticios (Zuo *et al.*, 2009). Por otro lado, se encuentra el baño ultrasónico que utiliza varios transductores extendidos en la base del baño (Figura 6b), posiblemente sean la aplicación más popular de los ultrasonidos de potencia, aunque se utilizan normalmente como equipos de limpieza de material de laboratorio, éstos se han usado para acelerar los procesos de transferencia de materia en medios líquidos (Patil *et al.*, 2009), se califican como equipos ultrasónicos simples y compactos; sus principales limitaciones son la poca potencia que suministran al medio, la variación del campo acústico dentro del baño y la dificultad en el control de la temperatura (Bendicho *et al.*, 2012).

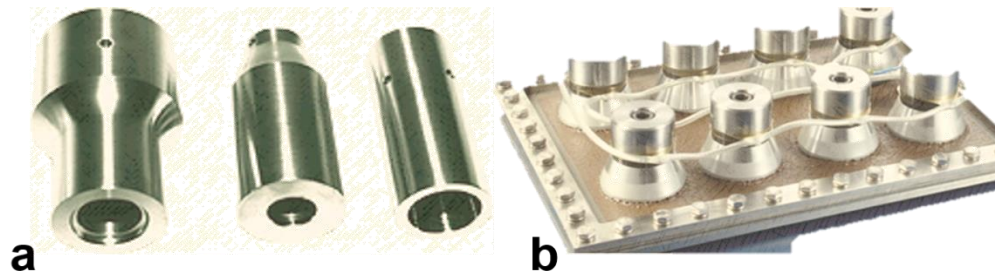


Figura 6. Transductores ultrasónicos de (a) sonda y (b) baño.

En la Figura 7 se muestra los sistemas utilizados para el US de baño y sonda.

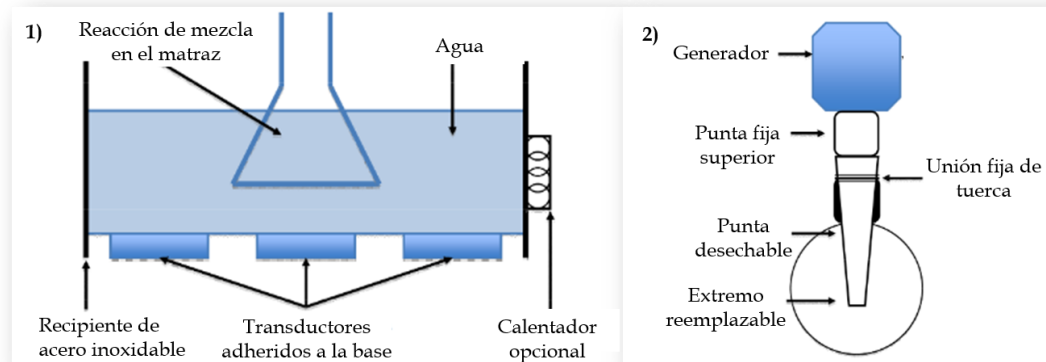


Figura 7. Sistema de 1) baño y 2) sonda ultrasónica. Tomado de Mason et al., 2005.

1.7.3.3. Aplicación del ultrasonido en alimentos

La aplicación del ultrasonido de potencia en alimentos selectos se ha reportado recientemente, demostrando ser útil tanto en el procesamiento como en la conservación de alimentos, algunas aplicaciones se presentan en la Tabla 2.

1.7.3.4 Efectos del ultrasonido en microorganismos

La efectividad del US de potencia en microorganismos está relacionada por factores como el tipo de microorganismo, potencia, frecuencia y el tiempo de sonicación; la interacción entre la energía acústica y los microorganismos es complicada, el US puede aumentar o disminuir la actividad microbiana; en la mayoría de los casos, el US se utiliza como auxiliar de procesamiento para inactivar microorganismos con el fin de asegurar la inocuidad de los alimentos, sin embargo, para esto se requiere una alta potencia acústica.

Tabla 2. Aplicación del ultrasonido de potencia en alimentos.

Proceso	Aplicación del US de potencia	Referencia
Mezclado y emulsificación	Mejora la textura y el sabor en bases emulsificadas como sopas y salsas.	(Mason, 1999)
Cristalización y precipitación	Puede iniciar la cristalización y controlar el crecimiento de cristales en medios saturados, produciendo cristales uniformes.	(Mason, 1999)
Congelación	Mejora el coeficiente de transferencia de calor y se ha utilizado para acelerar procesos de congelación por inmersión en papa.	(Mulet <i>et al.</i> , 2003)
Deshidratación	Mejora los procesos de secado en arroz, zanahoria, cebolla y deshidratación osmótica de manzana.	(Mulet <i>et al.</i> , 2003)
Limpieza y desinfección de alimentos	Aumenta la eficiencia de desinfectantes para la descontaminación de agua, por remoción de contaminación biológica debido al colapso cavitacional cerca de la superficie.	(Soria y Villamiel, 2010)
Inactivación microbiana y de enzimas	Proporciona un método para mejorar dichos procesos en virtud de los efectos de la cavitación.	(Delgado, 2011)

La cavitación transitoria produce puntos calientes, ondas de choque, formación de agua en las interfaces sólido-líquido y radicales libres, mientras que la cavitación estable producirá tensión superficial (Mason y Lorimer, 2002), todos estos efectos contribuyen a dañar las paredes y membranas celulares, resultando en la muerte celular de microorganismos patógenos, provocando que las células se rompan y desintegren, sin embargo, hay reportes en los que las células pueden recuperarse si encuentran las condiciones ambientales adecuadas (temperatura, pH, actividad de agua y nutrientes)

(Raso *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2009). Otra de las formas de inactivación asistida por US es el uso de la termosonicación, el cual consiste en someter al alimento a una combinación de ultrasonido con altas temperaturas (Demidróvel y Baysal, 2009), por otro lado, se ha dicho que el uso de temperatura combinada con ultrasonido puede llegar a afectar la conservación de los alimentos, sin embargo, estos estudios se refieren a casos en los que se usa más de 80 °C (Demidróvel y Baysal, 2009).

En los últimos años, la aplicación de US de potencia se ha extendido más allá de la simple inactivación de microorganismos, se ha demostrado su capacidad para aumentar el crecimiento de microorganismos beneficiosos para la producción de ciertos alimentos, como lo son las bacterias ácido lácticas (Yang *et al.*, 2008).

1.7.3.5. Efecto del ultrasonido en bacterias ácido lácticas

Las BAL al ser bacterias gram positivas, son más resistentes al US en comparación con las gram negativas, probablemente a la presencia de una capa gruesa de peptidoglicano en la membrana celular de estas bacterias (Yeo y Liong, 2013).

Nguyen *et al.* (2009) estudiaron la actividad fermentativa de bifidobacterias (*Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, *B. animalis ssp. lactis* y *B. longum*) en leche estimuladas por ultrasonido de alta intensidad y encontraron que, utilizando ultrasonido con 20 kHz de frecuencia, 50% de amplitud por 7 min podrían reducir el pH de la leche a 4.7, produciendo así, una fermentación más rápida en menor tiempo. Por otro lado, Ojha *et al.* (2016) realizaron un estudio sobre el efecto que produce la aplicación del ultrasonido de alta intensidad, sobre el perfil fermentativo de *Lactobacillus sakei* en un sistema modelo de carne, la bacteria fue inoculada en caldo MRS y en el sistema modelo de carne, aplicaron el tratamiento de ultrasonido con un nivel de potencia de 550 W, a una frecuencia de 20 kHz y a diferentes tiempos de sonicación (1-9 min). Los resultados mostraron que la producción de ácido láctico fue mayor en el caldo MRS en comparación con el sistema modelo de carne, sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las muestras que fueron tratadas con US y las que no llevaron este tratamiento, el resultado se le atribuye a que existió mayor producción de ácido láctico en el caldo MRS que en el sistema modelo de carne debido a que no existen azúcares que ayudarán a la fermentación.

1.7.3.6. Aplicación del ultrasonido de potencia en leche y sus derivados

El ultrasonido puede mejorar los procesos de pasteurización, salado y homogenización en leche y sus derivados, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Efecto del ultrasonido en los procesos de leche y sus derivados.

Producto	Proceso	Efecto del ultrasonido
Leche	Pasteurización y homogenización	Inactivación de enzimas como la coagulasa positiva. Rompimiento de los glóbulos grasos, aumentado la homogenización. Aumenta la digestibilidad de la grasa láctea.
Queso	Salado Emulsificación	Aumenta la penetración en salmueras. En procesos de atrapamiento de la grasa por el caseinato se obtiene mejora en la emulsificación.
Sorbete	Homogenización	Mejora las características de viscosidad.
Yogur y kumis	Pasteurización	Mejora las características de viscosidad.

Tomado de Delgado, 2011.

También se han reportado estudios para conocer el efecto del US en las propiedades fisicoquímicas de la leche. Así, por ejemplo, Raharintsoa et al. (1978) realizaron un estudio para comparar las viscosidades de la leche fresca y leche tratada con US y encontraron que la leche tratada con US disminuyó su viscosidad, una posible explicación de esta disminución podría ser el efecto de la homogenización que el US produce en el contenido de grasa, haciendo la leche más fluida debido a la reducción en el tamaño de los glóbulos de grasa. En otro estudio se reporta que la densidad de la leche sin tratar y tratada con US son muy similares (1.029 y 1.025 g/mL respectivamente), por lo tanto, la densidad es una propiedad de la leche que no cambia de manera importante durante la sonicación (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009; Walstra *et al.*, 2006). Tsukamoto et al. (2004) sonicaron leche de vaca del tipo descremada y entera, después de aplicado el tratamiento obtuvieron ligeros cambios en el pH. Existen algunas explicaciones posibles de por qué disminuye el pH de la leche después de la

sonicación y estas proponen que existe una formación de radicales libres a partir de las moléculas de agua, las cuales se dividen como OH^- e H^+ , lo que da lugar a cambios en esta propiedad (Sochard *et al.*, 1997). Por otra parte, Bermúdez-Aguirre *et al.* (2009) reportan que cuando la leche entera es sometida a termosonicación, existe un efecto sobre el contenido de proteína, disminuyendo su contenido en promedio en un 0.26%, la disminución puede atribuirse al uso de calor producido en el proceso. Krešić *et al.* (2008) realizaron un estudio donde se utilizó US para determinar el efecto en las propiedades físicas de proteínas de suero de leche, los resultados mostraron que existe un posible cambio en la conformación y estructura de la proteína, lo que provoca a cambios en su solubilidad, modificando la estructura de la proteína. Por último, se ha demostrado que cuando la leche es sometida al tratamiento ultrasónico, los glóbulos de grasa presentes reducen su tamaño, revelando un área superficial más grande y reduciendo considerablemente la concentración de fosfolípidos, dando a la leche una buena homogenización (Juliano *et al.*, 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materia prima

Se utilizó un producto lácteo artesanal (queso adobera comercial) el cual se produce en Tepatitlán, Jalisco, México. Además, se emplearon 3 tipos de leches comerciales: leche parcialmente descremada, entera y descremada pasteurizada marca Santa Clara las cuales fueron adquiridas en un supermercado en la ciudad de Puebla.

2.2. Métodos

La metodología utilizada se dividió en dos etapas, en la primera se llevó a cabo el aislamiento, la identificación, preservación, cinética de crecimiento y acidificación de bacterias ácido lácticas presentes en el queso adobera comercial. La segunda etapa consistió en la aplicación del ultrasonido de potencia a sistemas de leche inoculados con una de las bacterias aisladas del queso, determinando el efecto de su aplicación sobre el comportamiento microbiano y su acidificación, al mismo tiempo que evaluando el efecto provocado en los componentes de la leche (contenido de aminoácidos y morfología del glóbulo de grasa). A continuación, se describe la metodología empleada en la primera (secciones 2.3-2.9) y segunda (secciones 2.10-2.13) etapas, así como el análisis estadístico realizado (sección 2.14).

2.3. Identificación y preservación de microorganismos

El muestreo y aislamiento en queso adobera se realizó por parte del Centro Nacional de Recursos Genéticos ubicado en Tepatitlán, Jalisco; de este se aislaron bacterias ácido lácticas (BAL), se realizó su crecimiento utilizando caldo y agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), se incubaron en condiciones anaerobias a 28, 37 y 44 °C y se realizó la cuenta microbiana de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994, posteriormente se realizó la conservación de las cepas en caldo MRS con glicerol al 50%.

De las BAL aisladas, se trabajó únicamente con 6 cepas las cuales se identificaron como cepas de trabajo 12, 25, 48, 75, 106 y 151, estas fueron las cepas utilizadas para el desarrollo de la etapa I. La identificación de las BAL se realizó mediante la secuenciación del gen 16S rDNA, la cual se describe a continuación.

2.4. Caracterización genotípica de microorganismos

Para la extracción del ADN se utilizaron las cepas de trabajo con un crecimiento previo en caldo MRS de 24 h. La extracción se realizó en la Universidad Politécnica de Puebla, la biomasa celular se concentró mediante centrifugación en tubos de microcentrifuga (Velab, TGL-160, México) a una velocidad de 10,000 rpm durante 1 min, se pesaron 50 mg de cada cepa en una balanza analítica (Ohaus, Adventurer, EUA) (Figura 8a), la biomasa obtenida, se añadió a un tubo de lisis del sistema de extracción basado en resinas de intercambio iónico (Zymo Research, DNA ZR Fungal/Bacterial, EUA). La extracción del ADN se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Figura 8b).

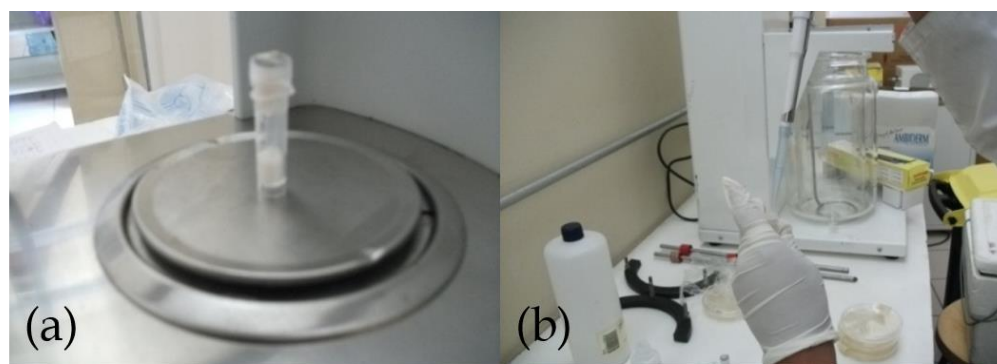


Figura 8. Pesada de la biomasa celular (a) y extracción de ADN de la biomasa celular (b).

El ADN obtenido se cuantificó con un espectrofotómetro (Agilent Technologies, UV-Vis G110 3-A, EUA) a 260 nm y se verificó la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% p/v, tomando 5 μ L de la muestra de ADN (Figura 9).



Figura 9. Adición de ADN en el gel de agarosa.

Posteriormente, se amplificó por PCR la región 16S del ARN ribosomal, para ello se utilizó 0.5 μ L de cada tubo de reacción iniciador sentido y anti sentido, a una concentración de 10 μ M, se le adicionaron 5 μ L de buffer de reacción, 0.4 μ L de ADN polimerasa (Promega), 3 μ L de $MgCl_2$ a una concentración de 1.5 μ M y 2 ng de ADN. La mezcla de la reacción se colocó en un termociclador (Bio-Rad, My-Cycler, EUA) como el de la Figura 10, a 94 °C durante 10 s para la desnaturalización, enseguida para la hibridación se colocó a 53 °C durante 30 s y para la extensión se realizó a 72 °C por 40 s, repitiendo esto durante 30 ciclos. Los fragmentos obtenidos de la amplificación fueron concentrados y purificados en un sistema de columna (Promega, Wizard SV Gel, EUA) para retirar el exceso de sales e iniciadores residuales de la reacción. La integridad y el peso molecular de cada muestra de ADN fueron verificados por la migración electroforética en un gel de agarosa al 0.8 % p/v, la secuenciación de este fragmento de ADN (ambas hebras, sentido y anti sentido) se llevó a cabo en la Unidad de Servicios Genómicos de Irapuato, Guanajuato, México, éstas secuencias fueron comparadas con otras secuencias publicadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information, GenBank, utilizando alineamientos locales mediante el programa BLASTn y tomando en cuenta solamente aquéllas secuencias con un porcentaje de similitud mayor o igual al 98%.



Figura 10. Termociclador My-Cicler.

2.5. Pruebas bioquímicas

Se realizaron las pruebas de oxidasa y catalasa a las cepas de trabajo, la catalasa se realizó mediante la prueba del peróxido de hidrógeno y la oxidasa mediante una

prueba colorimétrica con el reactivo de Kovacs, que identifica la presencia de la enzima citocromo oxidasa. Por último, se realizó la prueba de Tinción de Gram y se observaron en microscopio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Alemania) a 100x para conocer su morfología.

2.6. Curvas de crecimiento

Se preparó caldo MRS según las indicaciones del proveedor y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min y 15 libras de presión. Por cada 100 mL del caldo fueron inoculados 10 µL de cada cepa de trabajo, una vez realizada la inoculación, los caldos se colocaron en incubación en una estufa de cultivo (BINDER, BD-23, Alemania) a 28, 37 y 44 °C durante 48 h, tomándose muestras cada 4 h. La cuantificación de la población microbiana se realizó mediante el método de Miles y Misra, se emplearon cajas Petri con 15 mL de agar MRS previamente gelificado, marcándose 4 cuadrantes en la caja, en cada cuadrante se depositan 10 µL de muestra, previamente se realizaron las diluciones necesarias como se observa en la Figura 11, las cajas se incubaron en condiciones anaerobias a 28, 37 y 44 °C, durante 48 h. Finalmente se realizó la cuenta microbiana de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994.

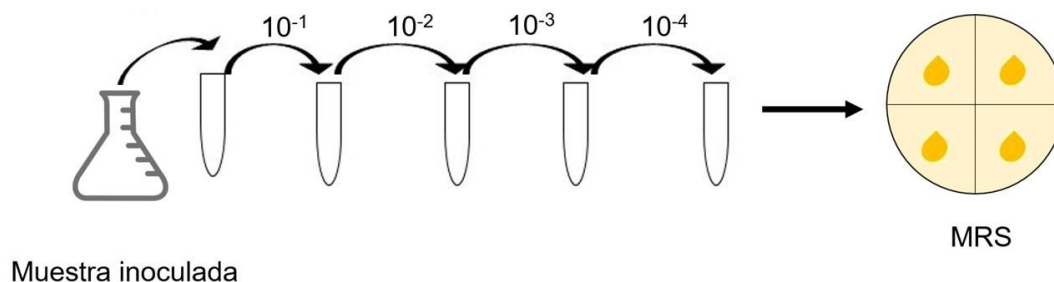


Figura 11. Método de siembra de Miles y Misra.

2.7. Parámetros de crecimiento

Con los datos del crecimiento microbiano, se calcularon los parámetros de crecimiento, se calculó la velocidad de crecimiento máxima y el tiempo de duplicación empleando las ecuaciones 1 y 2.

$$\mu_{max} = \frac{\ln(N) - \ln(N_0)}{t - t_0} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

μ_{max} = Velocidad de crecimiento máxima (h^{-1})

N_0 = Número de microorganismos inicial (UFC/mL)

N = Número de microorganismos final (UFC/mL)

t_0 = Tiempo inicial (h)

t = Tiempo final (h)

td = Tiempo de duplicación (h)

\ln = logaritmo natural

2.8. Cinéticas de acidificación

Se realizó la medición del pH, tomando una muestra de 2 mL de caldo MRS cada 4 h, usando un pH-metro previamente calibrado (Ultra Basic, Denver Instrument, EUA). A su vez, se llevó a cabo la determinación de acidez de acuerdo con el método 16.023 del AOAC (2000) que consistió en una titulación con NaOH 0.1 N. La acidez se expresó como porcentaje de ácido láctico que se determinó mediante la Ecuación 3.

$$\% \text{ Acidez (ácido láctico)} = \frac{V_1 \times N \times Meq}{V_2} \times 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

V_1 = Volumen de NaOH gastados (mL)

N = Normalidad del NaOH

Meq = mili equivalentes de ácido láctico

V_2 = Volumen utilizado de muestra (mL)

2.9. Selección de la cepa

Se realizó la selección de una sola cepa de BAL, los criterios de selección fueron: crecimiento a temperatura de 37 °C, velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación, cantidad de ácido láctico producido y disminución de pH, todo esto en el menor tiempo posible, con esta cepa se trabajó en la segunda etapa (aplicación de ultrasonido de potencia).

2.10. Preparación de los sistemas e inoculación del microorganismo

Se prepararon sistemas de leche de 100 mL cada uno, enseguida se realizó la inoculación con la cepa microbiana seleccionada adicionando una población aproximada de 1×10^4 UFC/mL (10 μ L de la cepa).

2.11. Aplicación de US de potencia

Se aplicó el proceso de sonicación con dos dispositivos ultrasónicos, el primero se realizó utilizando un baño ultrasónico (Elmasonic P70H, Elma Singen, Alemania) con 100% amplitud, 220 W de potencia, una frecuencia de 80 kHz y a diferentes tiempos de exposición (10, 30 y 90 min), manteniendo una temperatura de 37 ± 2 °C con ayuda de un baño de recirculación con controlador digital de temperatura (Polyscience, AD07R-20, EUA). Se utilizó agua destilada en su interior, los sistemas de leche se colocaron en bolsas de plástico estériles y se sumergieron en el baño ultrasónico como se muestra en la Figura 12 esto para evitar la contaminación con otros microorganismos.



Figura 12. Aplicación de tratamientos con baño ultrasónico.

El segundo equipo utilizado fue el ultrasonido de sonda (Hielscher UP400s, Teltow, Alemania), con 400 W de potencia, para este tratamiento se realizó un análisis exploratorio para determinar los tiempos de tratamiento, las condiciones empleadas fueron: 30 y 90% de amplitud, una frecuencia de 24 kHz durante 1, 3 y 5 min tomando como variable de respuesta, el crecimiento, disminución de pH y aumento de acidez. Se utilizó un sonotrodo de 22 mm de diámetro (Hielscher, H22L2D, Alemania) y se mantuvo una temperatura de 37 ± 2 °C durante los tratamientos, con ayuda del baño recirculador mencionado anteriormente. Se utilizó una célula de flujo (Hielscher, GD22K, Alemania) acoplada al ultrasonido de sonda (ver Figura 13) para someter a los

sistemas al tratamiento, el sonotrodo se desinfectó con alcohol etílico al 70% en cada tratamiento para mantener la inocuidad. Los tratamientos aplicados con ambos dispositivos ultrasónicos se realizaron de forma continua.



Figura 13. Aplicación de tratamientos con ultrasonido de sonda.

2.12. Determinación de potencia efectiva por calorimetría

Se determinó la potencia efectiva de los tratamientos de ultrasonido aplicados a los sistemas mediante el método calorimétrico de Torkamani *et al.* (2014). La potencia efectiva en el US de baño se determinó colocando 4 L de agua destilada en la tina del baño y se registraron los aumentos de temperatura empleando un termómetro digital; las condiciones utilizadas fueron las mismas que se mencionan en el apartado 2.10.

Para determinar la potencia efectiva en el US de sonda se colocaron 100 mL de cada sistema en un recipiente de cristal y se aplicó la sonicación de acuerdo con los tiempos y amplitudes mencionados en el apartado 2.9, de la misma manera, se registró el aumento de temperatura con ayuda de un termómetro digital. Todos los tratamientos se realizaron por duplicado.

El aumento de temperatura (dT/dt) se determinó de la pendiente de los datos de temperatura contra el tiempo para cada tratamiento. Por lo tanto, la potencia efectiva se calculó a partir de la Ecuación 4.

$$P_n = m_n c_p \left(\frac{dT}{dt} \right) \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

P_n = potencia efectiva determinada para el tratamiento (W)

m_n = masa utilizada en el tratamiento (kg)

c_p = calor específico para la muestra (J/kg * °C)

En el caso del US de baño el c_p utilizado fue el del agua con un valor de 4.180 KJ/Kg° C. Por su parte, para calcular el c_p de cada sistema utilizado en el US de sonda, se calculó a partir de su composición, el cual se determinó con el analizador Lactoscan LA (Nova Zagora, Bulgaria) empleando la ecuación de Choi y Okos (Ecuación 5) (Singh y Heldman, 2009).

$$c_p = \sum_{i=1}^n c_{pi} X_i \quad (\text{Ec 5})$$

Donde:

c_p = calor específico para la muestra (J/kg * °C)

$\sum_{i=1}^n$ = sumatoria del componente 1 al componente n

c_{pi} = calor específico para el componente i

X_i = fracción peso del componente i

Los c_p para los componentes en la leche se determinaron con las fórmulas siguientes (Singh y Heldman, 2009) utilizando la temperatura promedio (T) registrada de cada tratamiento:

Proteína $c_p = 2.0082 + 1.2089 \times 10^{-3} T - 1.3129 \times 10^{-6} T^2$

Grasa $c_p = 1.9842 + 1.4733 \times 10^{-3} T - 4.8008 \times 10^{-6} T^2$

Lactosa $c_p = 1.5488 + 1.9625 \times 10^{-3} T - 5.9399 \times 10^{-6} T^2$

Cenizas $c_p = 1.0926 + 1.8896 \times 10^{-3} T - 3.6817 \times 10^{-6} T^2$

Agua $c_p = 4.1762 - 9.0864 \times 10^{-5} T + 5.4731 \times 10^{-6} T^2$

2.13. Efecto de la aplicación de US de potencia en leche

Los sistemas de leche (después de ser tratados con los dispositivos ultrasónicos) se incubaron a 37 °C, durante 36 h tomándose muestras cada 4 h, a cada muestra se le realizó los siguientes análisis: comportamiento microbiano, acidificación, aminoácidos libres y morfología del glóbulo de grasa.

2.13.1. Comportamiento microbiano

La cuantificación de la población microbiana se realizó mediante el método de Miles y Misra descrito en el apartado 2.6, las cajas se incubaron en condiciones anaerobias a 37 °C, durante 36 h. Finalmente se realizó la cuenta microbiana de acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994.

2.13.2. Parámetros de crecimiento

Los parámetros de crecimiento se calcularon como se describió en la sección 2.7.

2.13.3. Acidez

Se realizó la medición de pH y acidez como se describió en la sección 2.8.

2.13.4. Morfología del glóbulo de grasa

La morfología del glóbulo de grasa presente en los sistemas tratados con US de baño y sonda se determinó mediante la prueba del Sudan III el cual consistió en colocar en un portaobjetos una gota de la muestra y una gota del colorante Sudan III (0.5 g de Sudán III en polvo se diluyen en 50 mL de alcohol etílico al 70%, calentando a baño maría a 50 °C hasta su disolución) y se cubrió con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas. Por último, se observó mediante un microscopio óptico (Carl Zeiss, Primo Star, Alemania) a 40x.

2.12.5. Cuantificación de aminoácidos libres

El contenido de aminoácidos libres se determinó de acuerdo con el método de Cadmio-Ninhidrina, el cual determina la concentración de grupos amino mediante una reacción colorimétrica (Wick *et al.*, 2004).

Se tomaron 2.5 mL de los sistemas de leche tratados con US y se adicionaron en 50 mL de solución de citrato trisódico 62.5 mM a 50 °C. La mezcla se colocó en un baño de agitación (Polyscience, WDS20, EUA) durante 1 h a 180 rpm y a una temperatura de 50 °C. Se realizaron diluciones de esta mezcla utilizando solución de citrato trisódico 62.5 mM, como se muestra en la Tabla 4, enseguida, se añadieron 100 µL de la dilución a un tubo eppendorf, 200 µL de agua destilada y 600 µL de reactivo de Cadmio-Ninhidrina el cual se preparó como se muestra a continuación, 0.8 g de ninhidrina se diluyeron previamente en 80 mL de etanol absoluto y 10 mL de ácido acético glacial, seguido de la adición de 1 g de cloruro de cadmio previamente diluido en 1 mL de agua destilada. El tubo de reacción se calentó de manera que la muestra alcanzó una temperatura de 84 °C durante 5 min, se enfrió y centrifugó (Hettich 320R, Massachusetts, EUA) a 13000 rpm durante 5 min. Se colocaron 200 µL de la fase superior de cada muestra en microplacas y se leyó a una longitud de onda de 493 nm en un lector de placas (Multiskan FC, Vantaa, Finlandia). Se utilizó como blanco 100 µL de solución de citrato trisódico.

Tabla 4. Dilución de la fracción de citrato para la prueba de aminoácidos libres.

Dilución	Fracción o dilución de citrato (µL)	Buffer (µL)
1/1	100	0
1/2	100 de 1/1	100
1/4	100 de 1/2	100
1/8	100 de 1/4	100

La curva de calibración se construyó con soluciones de leucina de 0-0.8 mM preparadas con citrato trisódico 62.5 mM como se muestra en la Tabla 5. Los resultados fueron expresados en mg de leucina por mL de leche. Este análisis se realizó por duplicado.

Tabla 5. Preparación de la curva de calibración de Leucina (Leu).

Concentración de Leu (mM)	Solución 50 mM de Leu (μL)	Buffer (μL)
0	0	1000
0.1	2	998
0.2	4	996
0.3	6	994
0.4	8	992
0.5	10	990
0.6	12	988
0.7	14	986
0.8	16	984

2.14. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis ANOVA, de una y dos vías, empleando una prueba de comparación de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, usando el software Minitab v.16 (Minitab Inc, EUA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación de microorganismos presentes en queso adobera comercial

Se aislaron 21 bacterias ácido lácticas (BAL) de queso adobera comercial, de éstas se seleccionaron 6, reconocidas como cepas de trabajo 12, 25, 48, 75, 106 y 151 y se identificaron mediante secuenciación del gen 16S rDNA empleando la técnica de PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en lo que la secuencia blanco es copiada fielmente, para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay *et al.*, 2013).

En la Figura 14 se presentan los fragmentos de ADN de las cepas de trabajo 12, 25, 75, 106 y 151 en un gel de agarosa al 0.8%.

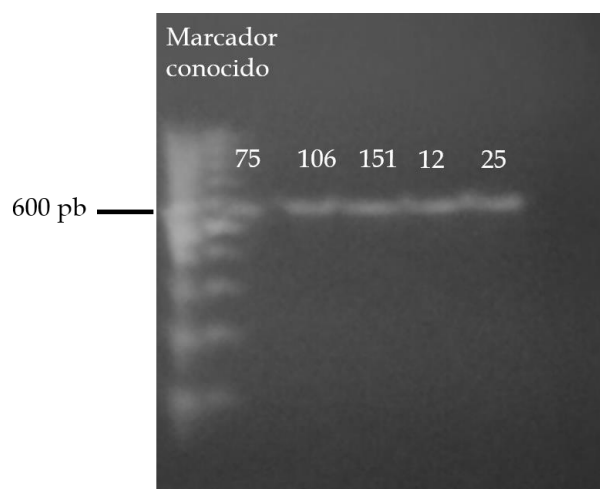


Figura 14. Fragmentos de ADN en gel de electroforesis de agarosa al 0.8%

Como se observa en la Figura 14, las cepas 12, 25, 75, 106 y 151 tuvieron una longitud de banda de 600 pares de bases (pb); las secuencias de este fragmento de ADN mostraron que correspondieron a *Enterococcus* con un porcentaje de cobertura del 96% de identidad, comparada con la base de datos utilizada. Posteriormente, se verificó la especie de *Enterococcus* con una reacción de PCR utilizando iniciadores específicos para el gen D-alanine--D-alanine ligase (ddl) de *Enterococcus faecium* dando un resultado

positivo. Por último, se realizó una segunda reacción de PCR específica, pero ahora con iniciadores para amplificar la región del gen de la cepa 48 (Figura 15).

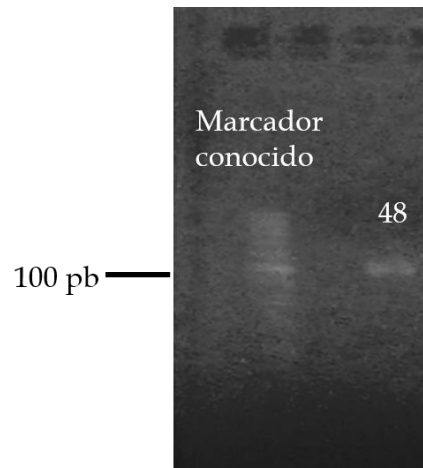


Figura 15. Gel de electroforesis de agarosa al 0.8% con una banda de 100 pb correspondiente a la cepa 48.

En el tercer carril de la Figura 15, se encuentra el producto de PCR de la cepa 48 correspondiente a un gen *GadB*, el cual fue identificado como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* de acuerdo con la base de datos.

Los estudios de PCR para identificar especies de BAL han sido muy exitosos, algunos estudios reportan que *Enterococcus faecium* presenta una banda de 600 pb (Weiss *et al.*, 2010), característica de este microorganismo, por otra parte, Ali *et al.* (2016) identificaron una cepa de *Enterococcus faecium* con una banda de 620 pb por ampliación de PCR; en estudios recientes, se confirmó que al utilizar el gen *ddl* se puede identificar la especie de *Enterococcus faecium* (Arshadi *et al.*, 2017). Con respecto a *Lactococcus*, Nomura *et al.* (2000) reportaron que el gen *GadB* es característico de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, lo que indica la similitud con la identificación realizada en este trabajo; es de suma importancia el hallazgo de BAL en quesos de tipo artesanal, ya que su presencia indica que son las responsables de desarrollar las características sensoriales de estos productos (González-Córdova *et al.*, 2016).

En los últimos años, se han realizado estudios para aislar BAL presentes en productos artesanales como lo reporta Fuentes *et al.* (2017) que realizaron un estudio donde aislaron BAL autóctonas de queso doble crema y quesillo colombiano,

encontrando 32 bacterias de este tipo, dentro de las especies identificadas se encontró *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc citreum*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, entre otros. Así mismo, Jiménez-Espinoza et al. (2017) aislaron BAL de queso adobera artesanal elaborado en el estado de Jalisco, identificando BAL de la especie *Lactobacillus*, estos resultados coinciden con los obtenidos en este trabajo, ya que se identificaron especies de BAL características de este tipo de productos. Por otra parte, las especies identificadas presentan una variedad de aplicaciones sobre todo en el sector lácteo, por ejemplo, *Enterococcus faecium* se ha utilizado para la producción de quesos madurados contribuyendo a desarrollar el sabor y olor al producir diacetilo y otros compuestos volátiles (Morandi et al., 2006) y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* al utilizarse como cultivo iniciador para producir bebidas fermentadas a base de leche, también se utiliza en quesos, crema ácida, entre otros (Ramírez et al., 2011).

3.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas de catalasa y oxidasa aplicadas a las cepas de trabajo resultaron negativas debido a que en la primera no presentaron producción de burbujas cuando se adicionó peróxido de hidrógeno en los frotis; en la prueba de oxidasa no se presentó cambio de color al agregar el reactivo de Kovacs; estas pruebas son características de las BAL, ya que indican que las bacterias son incapaces de crecer en medios ricos en oxígeno al no poseer oxidasa (MacFaddin, 2003).

Con respecto a la tinción de Gram, las BAL identificadas presentaron una coloración azul lo que es característico de las bacterias Gram positivas, en la Figura 16 se presenta el resultado de la tinción de Gram, la coloración presentada por las cepas se debe a que las bacterias Gram positivas carecen de una membrana externa, pero en su lugar poseen una pared celular más gruesa, con mayor proporción de peptidoglicanos, disminuyendo así el espacio entre las moléculas y evitando que pueda escaparse el complejo yodo-cristal violeta que es el que proporciona la coloración azul (Yang et al., 2012).

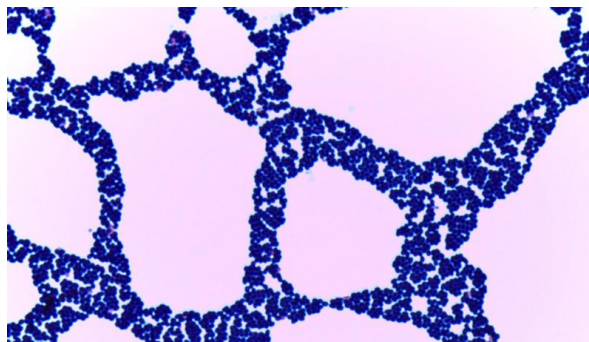


Figura 16. Tinción de Gram de la cepa 12 observada en microscopio óptico a 100x.

Finalmente, respecto a la morfología de las cepas de trabajo, éstas presentaron una morfología de cocos y diplococos. Según lo reportado por Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016) las BAL del género *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* dan resultados negativos al realizar las pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa, de igual manera éstas BAL resultaron Gram positivas durante la tinción, estos resultados son los característicos de bacterias del tipo ácido lácticas (Da Silva *et al.*, 2016).

3.3. Curvas de crecimiento

Las BAL son microorganismos ampliamente utilizados en la industria alimentaria sobre todo en los procesos fermentativos donde producen cambios favorables de textura, sabor y aroma, además contribuyen a conservar a los alimentos; otros beneficios que ofrecen estas bacterias es favorecer la colonización en el intestino lo que contribuye a mejorar enfermedades gastrointestinales, por lo cual se sugiere que éstos microorganismos se encuentren en poblaciones de alrededor de 1×10^6 o 1×10^7 UFC/mL (Parra, 2010).

En la Figura 17 se muestran las curvas de crecimiento de BAL aisladas de queso adobera. Se observa en general un crecimiento favorable de todas las BAL provenientes de queso adobera, se presentó un crecimiento exponencial después de las 4 h de incubación, la fase media exponencial se obtuvo a las 8 h y la fase estacionaria se alcanzó a las 12 h, cabe aclarar que las condiciones de temperatura fueron diferentes, las cepas 25, 48, 106 y 151 crecieron a una temperatura de 37 °C, mientras que la cepa 12 creció a 28 °C y la cepa 75 a 45 °C, por lo que hay una influencia de la temperatura sobre éstas cepas, generalmente las BAL crecen a temperaturas entre 37 a 44°C (Collado,

2005), sin embargo, la cepa 12 fue la que alcanzó una mayor población a pesar de crecer a 28°C, esto puede deberse a que se mantuvieron las condiciones de temperatura que se utilizan para elaborar el queso adobera (temperatura ambiente) (Ruvalcaba *et al.*, 2011).

Las cepas 12 y 75 alcanzaron el máximo crecimiento a las 12 h, con una población de $5.73 \times 10^{10} \pm 0.84$ y $1.28 \times 10^{10} \pm 0.43$ UFC/mL, respectivamente, contrario a lo que presentó la cepa 25 alcanzando una población de $8.15 \times 10^8 \pm 0.12$ UFC/mL. A pesar de ello, el crecimiento de BAL aisladas de queso adobera fue alto, las BAL son microorganismos presentes en todo el proceso del queso adobera, provocando la acidificación de la leche, lo que da lugar a las características típicas de este queso (Higuera-Ciapara, 1986; Torres-Llanez *et al.* 2006), demostrando que son útiles, pues desarrollan atributos sensoriales en la producción de quesos. En queso adobera se ha reportado la presencia de ciertas BAL, entre ellas *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus faecium* (Ruvalcaba *et al.*, 2011; Jiménez-Espinoza *et al.*, 2017).

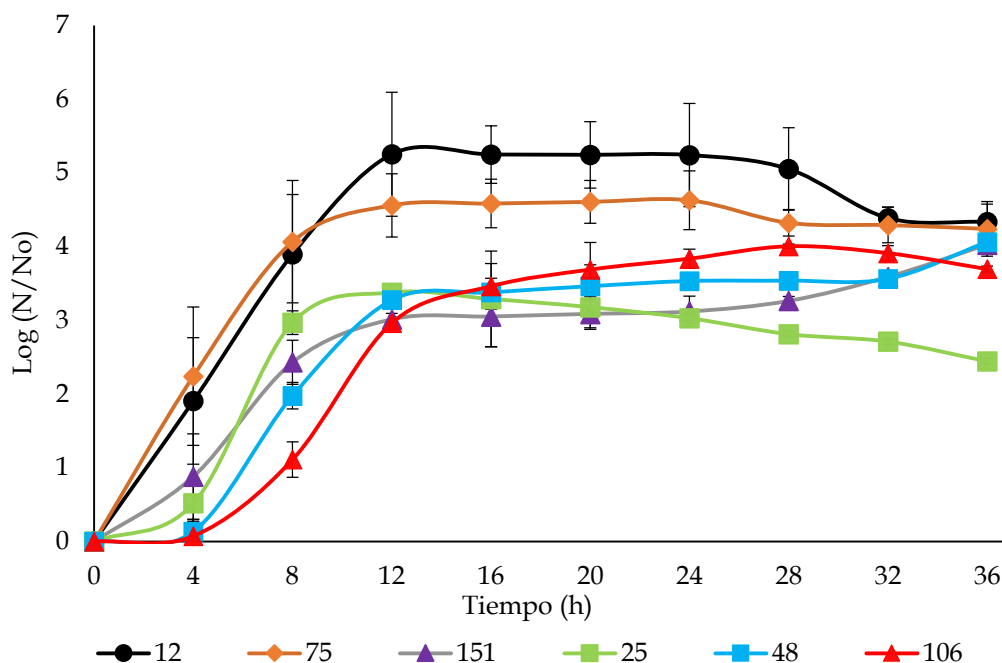


Figura 17. Curvas de crecimiento de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera.

Witzler et al. (2017) evaluaron el crecimiento de *Enterococcus faecium*, la cual fue aislada de queso tafí, indicando que éste crece alrededor de 6 ciclos logarítmicos (CL) en un periodo de 16 h, lo que es similar a lo encontrado en este trabajo debido a que la cepa 12 identificada como *Enterococcus faecium*, fue la que mostró mayor crecimiento, alcanzando más de 5 CL después de 12 h de incubación. Por otro lado, Olivera (2011) aisló BAL de leche bovina encontrando que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tiene un crecimiento de 2.85 CL después de 8 h de incubación, en este estudio la cepa 48 identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tuvo un crecimiento de 1.97 CL después de 8 h de incubación, lo cual es menor a lo reportado por Olivera (2011), sin embargo, el crecimiento de BAL depende de los nutrientes y factores extrínsecos (Parra, 2010).

3.4. Parámetros de crecimiento

El crecimiento microbiano se define como un incremento del número de células o de la biomasa producida, siendo importante determinar la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación de la población, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en el número de células por unidad de tiempo, mientras que el tiempo de duplicación es el tiempo necesario para que se duplique una población bacteriana, éste es usado con frecuencia para comprobar el efecto positivo o negativo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Mandigan *et al.*, 2009). En este trabajo se determinaron la velocidad de crecimiento máxima y el tiempo de duplicación de cepas aisladas de queso adobera, en la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Velocidad de crecimiento máxima (μ_{max})* y tiempo de duplicación (td) de cepa aislada de queso adobera.

Cepa	μ_{max} (h ⁻¹)	td (h)
75	1.26 ± 0.05 ^a	0.56 ± 0.02 ^a
25	1.20 ± 0.03 ^a	0.58 ± 0.01 ^a
12	1.07 ± 0.12 ^a	0.66 ± 0.07 ^a
151	0.91 ± 0.03 ^a	0.77 ± 0.02 ^a
48	1.08 ± 0.03 ^a	0.64 ± 0.01 ^a
106	0.93 ± 0.19 ^a	0.76 ± 0.16 ^a

*Media ± desviación estándar (n = 4) Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p < 0.05).

Los parámetros de crecimiento calculados mostraron que no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) de las cepas aisladas de queso adobera, por lo que la temperatura de crecimiento y el tipo de microorganismo no influyeron sobre estos parámetros, sin embargo, sí hay efecto en el número de células viables. Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016) realizaron el aislamiento de BAL autóctonas de leche y encontraron que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* presentó una velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}) de 0.37 h^{-1} lo que es menor a lo obtenido en este trabajo, ya que la cepa 48 identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tuvo una μ_{\max} de 1.08 h^{-1} . Por otro lado, Adamberg et al. (2003) reportaron una μ_{\max} para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* de 0.1, 0.4 y 0.98 h^{-1} a temperaturas de 10, 20 y $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que indica que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* identificado en este trabajo creció más rápido. Por otro lado, Sarantinopoulos et al. (2003) determinaron la μ_{\max} de *Enterococcus faecium* el cual fue aislado de queso feta griego, presentando un valor de 1.26 h^{-1} , que es similar a lo obtenido en este trabajo para la cepa 75 identificada como *Enterococcus faecium*. Agudelo et al. (2010) menciona que, la μ_{\max} depende de la concentración de nutrientes disponibles y la temperatura de crecimiento, como ya se mencionó anteriormente la temperatura no influyó en este parámetro, sin embargo, sí efecto en la población microbiana. Con respecto al tiempo de duplicación (td), Morandi et al. (2005) reportan un td para *Enterococcus faecium* de 0.58 h a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y de 1.18 h a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual es similar a lo obtenido en este trabajo.

3.5. Cinética de acidificación

Las BAL se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas, las primeras producen sólo ácido láctico como producto final de la degradación de lactosa, mientras que las heterofermentativas producen ácido láctico, CO_2 , etanol y/o acetato (Parra, 2010); dentro de las BAL homofermentativas se encuentran los géneros *Enterococcus* y *Lactococcus* que fueron géneros identificados en este trabajo.

Los resultados de acidez expresada como ácido láctico y de pH de BAL aisladas de queso adobera, se presentan en las Figuras 18 y 19, respectivamente.

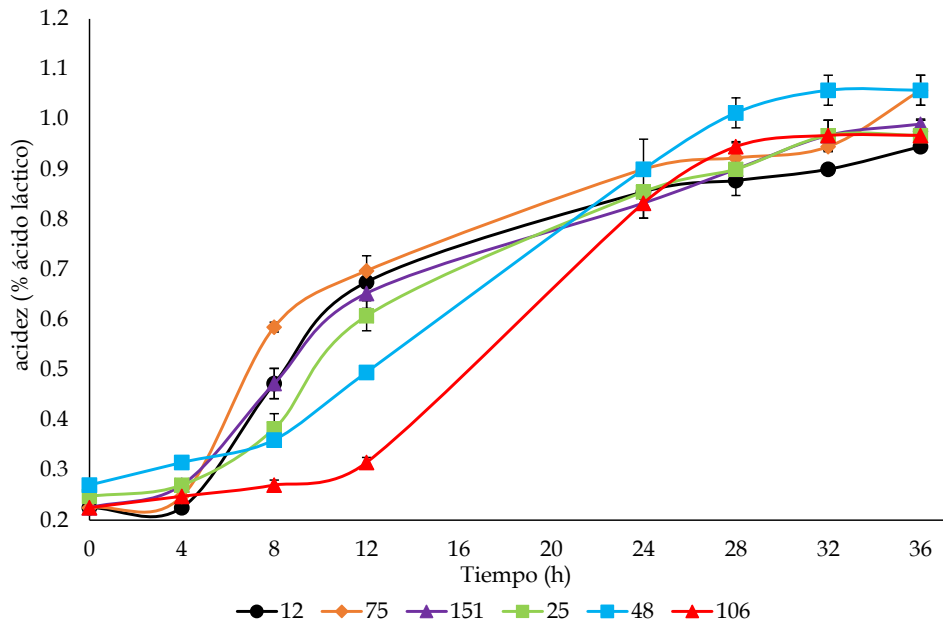


Figura 18. Cinética de acidificación (% ácido láctico) de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera.

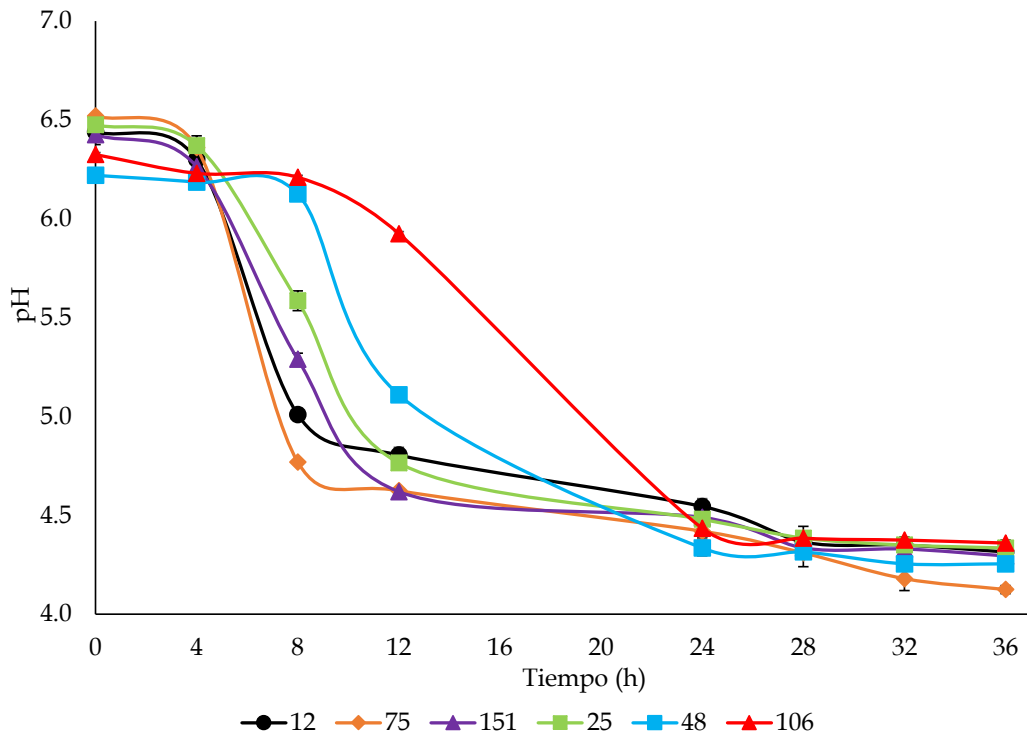


Figura 19. Cinética de pH de bacterias ácido lácticas aisladas de queso adobera.

En la Figura 18 se observa un aumento de la producción de ácido láctico, siendo la cepa 48 la de mayor producción ($1.06\% \pm 0.03$) y la cepa 12 la de menor producción ($0.95\% \pm 0.01$ de ácido láctico). Por otro lado, se observó una disminución de pH donde la cepa 75 tuvo un pH de 4.13 ± 0.02 y la cepa 48 de 4.26 ± 0.02 , después de la incubación. Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016) reportaron que *L. lactis* subsp. *lactis* aislado de queso fresco artesanal produce 0.75% de ácido láctico después de 48 h de incubación, lo que es similar a lo obtenido en este trabajo, indicando que las cepas aisladas de quesos artesanales presentan % de acidez bajo en comparación con otras BAL. Olivera (2011) evaluó la modificación de pH de BAL aisladas de leche cruda bovina, indicando que el pH disminuye alrededor de 5.69 tras 6 h de incubación. Cheigh et al (2002) reportan que el pH del medio MRS inoculado con *L. lactis* disminuye de 6.4 a 5.06 tras 12 h, mientras que Souza et al. (2017) reportaron la disminución del pH del mismo medio inoculado con *L. lactis* subsp. *lactis*, tras 24 horas de incubación a diferentes temperaturas, reportando que fue de 5.12, 5.2 y 5.14 cuando se incubó a 37, 30 y 40 °C, respectivamente. Por otro lado, Sarantinopoulos et al. (2003) cambios de pH en MRS inoculado con *Enterococcus faecium* de 6.4 a 4.85 tras 24 h de proceso. Por tanto, *Enterococcus* y *Lactococcus* aislados de queso adobera son microorganismos que podrían ser utilizados en procesos fermentativos pues a pesar de obtener bajo % de ácido láctico modifican el pH del medio dependiendo del tiempo y temperatura de incubación.

3.6. Selección de la cepa

La selección de la cepa para la aplicación de US se determinó primero con base en los resultados de PCR, debido a que la gran mayoría de cepas resultaron ser *Enterococcus* y solo una *Lactococcus*, se tomó la decisión de trabajar con *L. lactis* subsp. *lactis*, además de ser la cepa que creció a 37 °C.

3.7. Aplicación de ultrasonido de sonda

Se realizaron pruebas preliminares para determinar frecuencias y tiempos de tratamiento del ultrasonido de sonda, se utilizó leche parcialmente descremada inoculada con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, las variables de respuesta fueron el comportamiento microbiano, producción de ácido láctico y modificación de pH. Los resultados se presentan en las Figura 20, 21 y 22.

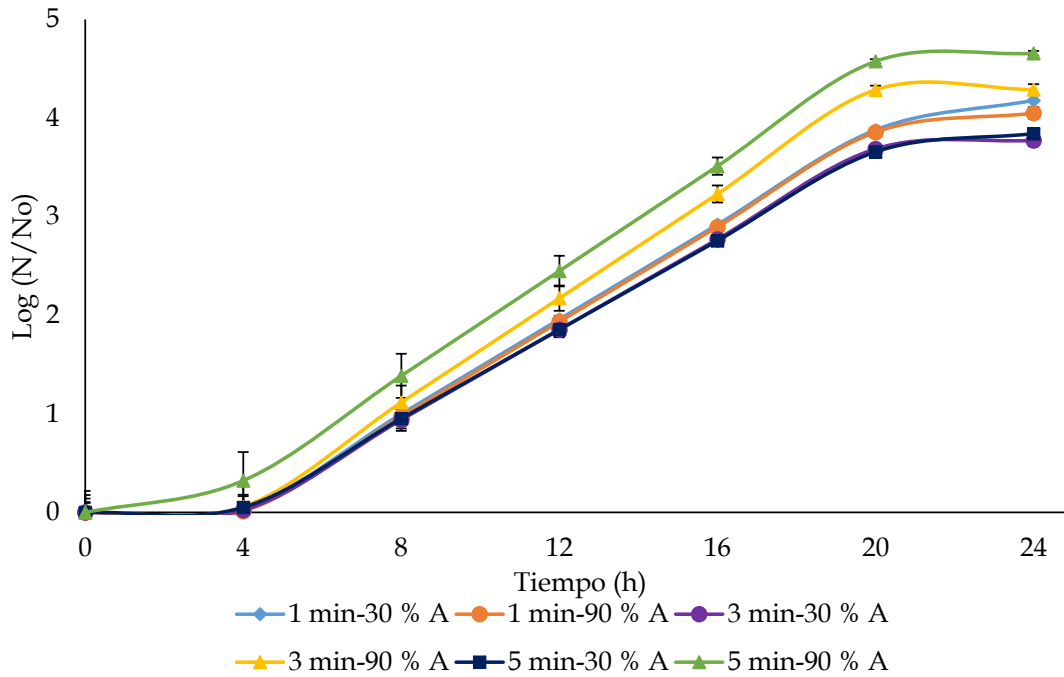


Figura 20. Cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en leche parcialmente descremada y tratada con US de sonda.

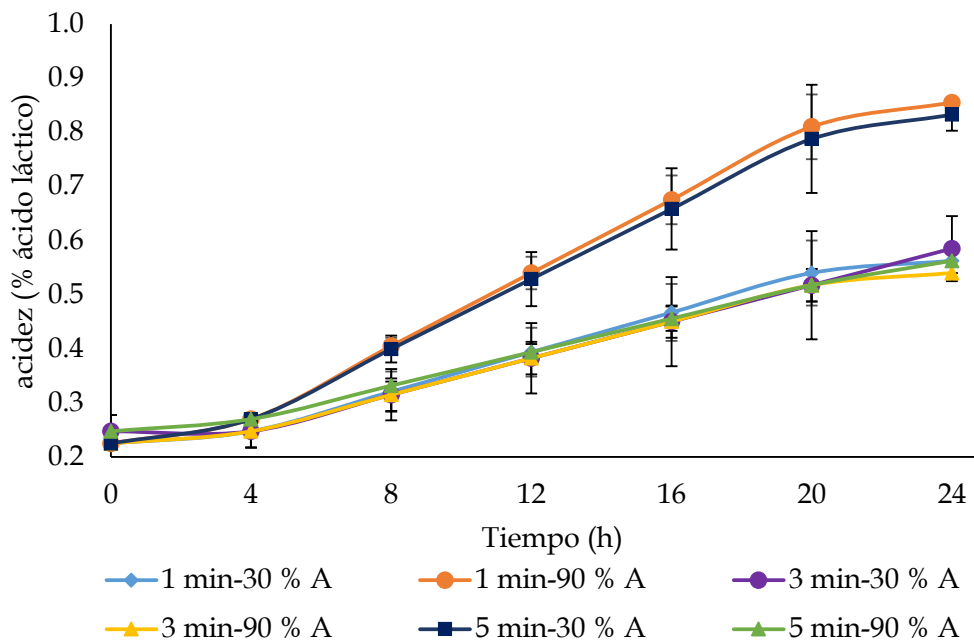


Figura 21. Cinética de acidificación (% ácido láctico) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en leche parcialmente descremada y tratado con US de sonda.

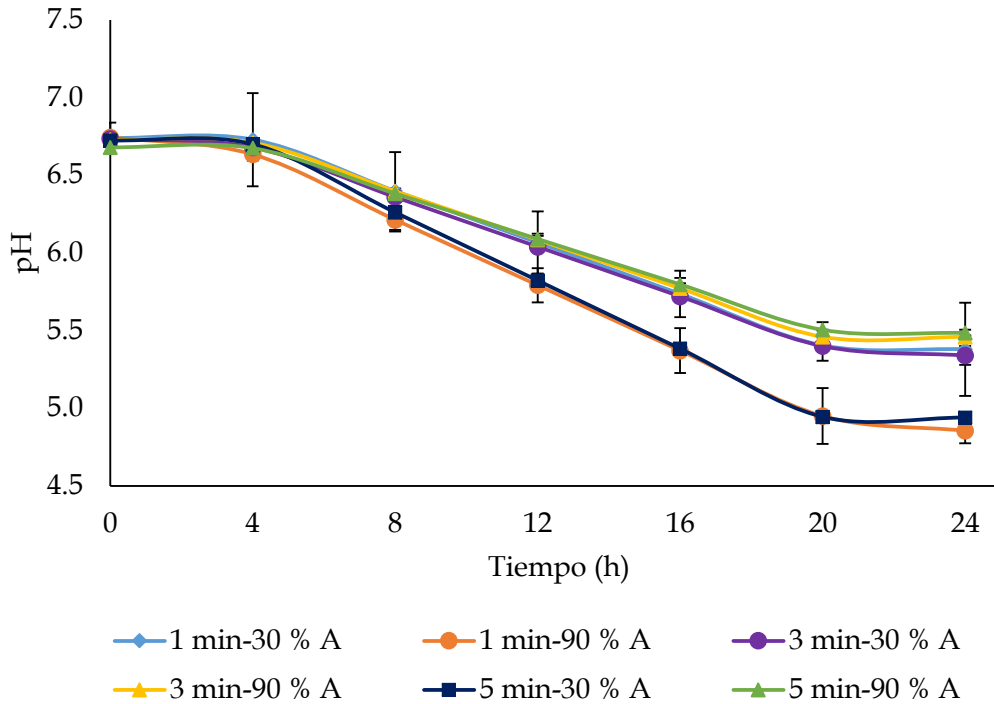


Figura 22. Cinética de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en leche parcialmente descremada y tratada con US de sonda.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que el crecimiento máximo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se presentó al aplicar 3 y 5 min con 90% de amplitud, la producción de ácido láctico fue mayor con 1 y 5 min pero diferente amplitud 90 y 30% respectivamente, mientras que el valor de pH fue muy similar tanto a amplitudes como tiempos de tratamiento. El interés principal de esta prueba preliminar fue seleccionar las condiciones que afectaran menos a la población microbiana, es decir que mantuvieran el crecimiento del microorganismo, a pesar de que las modificaciones de parámetros de fermentación no fueran tan favorables. Por lo que se decidió trabajar a tiempos de 1 y 5 min y amplitudes de 30 y 90%. Algunos autores reportan que el tiempo de tratamiento utilizado con US de sonda, debe ser pequeño para que los microorganismos tengan una reproducción celular mayor (Dahroud *et al.*, 2016).

3.8. Potencia efectiva por calorimetría de ultrasonido de potencia

Se determinó la potencia efectiva aplicada a los sistemas de leche de acuerdo con lo mencionado en la metodología, en la Tabla 7 se presentan los datos obtenidos de la potencia efectiva para el US de sonda en muestras con un volumen de 100 mL, la potencia del US de sonda reportada para este equipo era de 400 W.

Tabla 7. Potencia efectiva real entregada a los sistemas tratados con ultrasonido de sonda.

Sistema	Tratamiento		Potencia efectiva (W)
	Tiempo (min)	Amplitud (%)	
Parcialmente descremada	1	30	27.57 ± 0.28
	5	30	27.48 ± 0.79
	1	90	84.91 ± 0.31
	5	90	82.66 ± 0.76
Entera	1	30	28.58 ± 0.61
	5	30	27.30 ± 0.55
	1	90	85.88 ± 0.16
	5	90	74.49 ± 0.21
Descremada	1	30	26.71 ± 0.16
	5	30	26.96 ± 0.11
	1	90	86.84 ± 0.16
	5	90	75.73 ± 0.14

Nota: Los valores dados son con una media $n = 4 \pm$ desviación estándar.

Hani et al. (2017) determinaron la potencia real entregada al utilizar US de potencia, para esto realizaron un análisis de calorimetría y encontraron que al utilizar 50, 70 y 100% de amplitud obtuvieron 38.50, 53.25 y 68.00 W de potencia real, lo que difiere con los resultados obtenidos en este estudio, ya que al utilizar 90% de amplitud se obtuvo una potencia de 74 a 85 W. Por otro lado, Sivakumar y Pandit (2001) reportaron que al utilizar US de sonda con 30% de amplitud tuvieron 22.1 W de potencia real entregada, esto coincide con los resultados obtenidos ya que al utilizar

30% de amplitud se tuvo de 27 a 28 W de potencia entregada, esto dependiendo del tiempo de tratamiento. Las gráficas obtenidas con la pendiente de la temperatura contra el tiempo se presentan en el Anexo A.

Por otro lado, al calcular la potencia real para el US de baño, se determinó la relación entre temperatura y tiempo, y se obtuvo que la energía real entregada fue de 157.17 W, lo que coincide con Sivakumar y Pandit (2001) que reportaron una potencia real entregada de 120 W al utilizar US de baño. La gráfica obtenida de la relación temperatura y tiempo se presenta en el Anexo B.

3.9. Aplicación del ultrasonido de potencia sobre el comportamiento microbiano de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche bovina

Se evaluó el comportamiento microbiano de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en sistemas de leche con diferentes contenidos de grasa, aplicando ultrasonido de potencia con dos dispositivos ultrasónicos: baño y sonda.

La Figura 23 muestra el comportamiento microbiano de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en leche tratada con US de baño, se observa que el microorganismo tuvo un crecimiento exponencial en todas las leches tratadas con US, el crecimiento después de 36 h osciló de $3.80 \times 10^8 \pm 0.05$ a $1.25 \times 10^{10} \pm 0.35$ UFC/mL presentando un mayor crecimiento con leche parcialmente descremada, si bien la leche proporciona todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de BAL, existen nutrientes que pueden aumentar o disminuir la población microbiana (Cavanagh *et al.*, 2015). Valbuena *et al.* (2008) evaluaron el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche descremada observando un aumento de 4 CL después de 15 h de incubación. Ramírez-López y Vélez-Ruíz (2016) evaluaron el crecimiento de *Lactococcus lactis* en leche entera obteniendo un aumento de 4.5 CL después de 12 h, esto demuestra que hay una influencia de la cantidad de grasa presente en la leche que, afectó el crecimiento de *Lactococcus*.

Por su parte, la aplicación de US de baño influyó en el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ya que cuando no se aplicó US se presentó menor crecimiento (4 CL aproximadamente), mientras que al recibir tratamiento durante 10 y 90 min se alcanzaron 4.14 y 5.62 CL, respectivamente; como era de esperarse tiempos prolongados de tratamiento estimularon el crecimiento, debido a que puede haber una

transferencia de calor que afecta el desarrollo del microorganismo (Gómez-Díaz y López-Malo, 2009). Algunos estudios reportan que el crecimiento de BAL es favorable al aplicar tiempos largos de tratamiento con US de potencia (Nguyen *et al.*, 2009), sin embargo, esto depende también de la potencia y amplitud empleadas.

Con respecto a la aplicación de ultrasonido de sonda sobre el comportamiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, los resultados se presentan en la Figura 24. Se observó que el US de sonda también generó una estimulación del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en todos los sistemas de leche, el crecimiento después de 36 h osciló de $1.05 \times 10^9 \pm 0.33$ a $1.35 \times 10^9 \pm 0.65$ UFC/mL, presentando mayor crecimiento en leche parcialmente descremada y condiciones de 1 min y 90% de amplitud.

Otro factor que influye en el crecimiento de BAL al aplicar US de potencia, es la manera en que se aplican los tratamientos de ultrasonido (pulsos continuos e intermitentes). Tabatabaie y Mortazavi (2008) reportaron que la aplicación de US de potencia de forma intermitente reduce la población de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* en leche reconstituida. Racioppo *et al.* (2017) reportaron de igual manera que, al aplicar US de potencia de forma intermitente el crecimiento microbiano disminuye de 1 CL. En este trabajo se utilizó US de potencia de manera continua, lo que favoreció el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

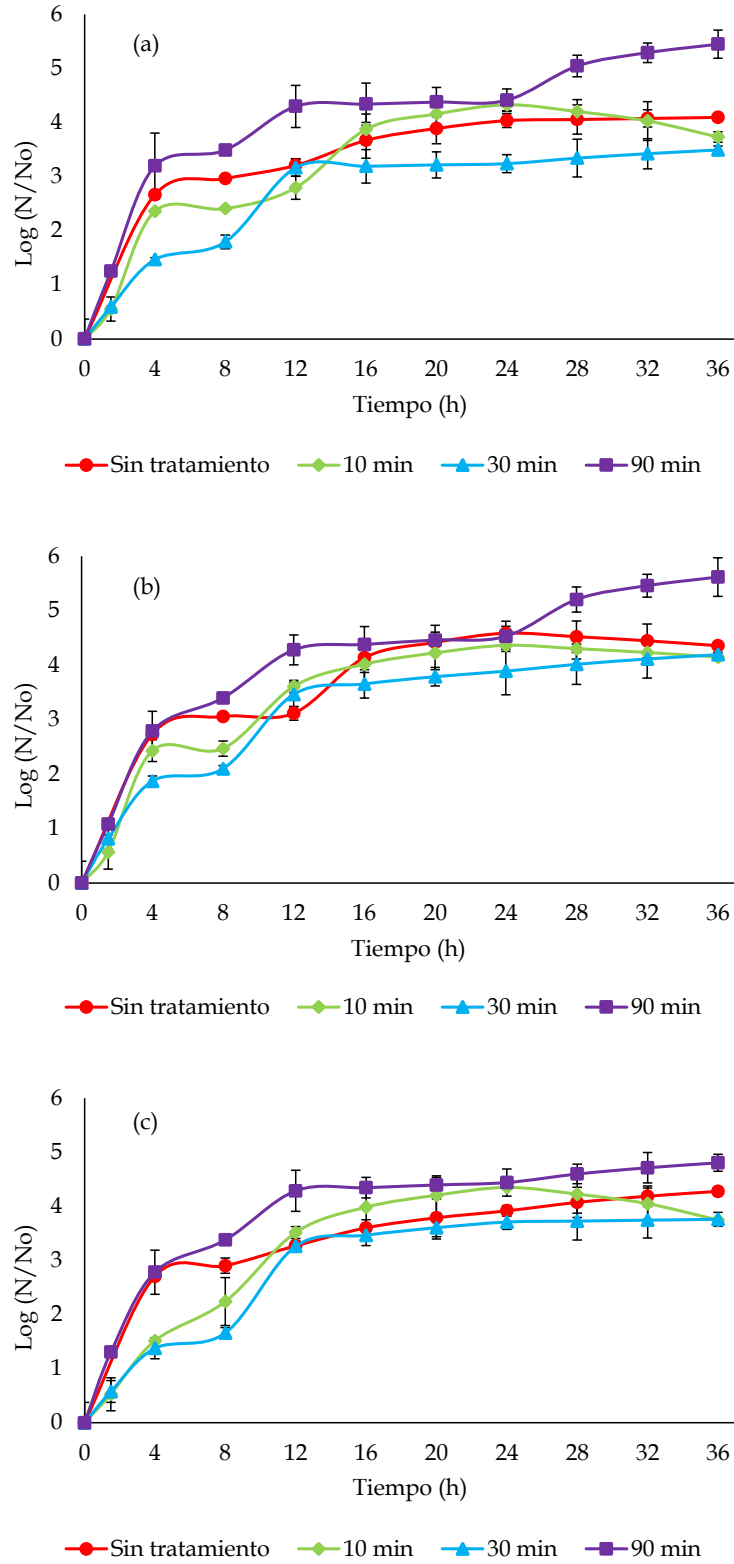


Figura 23. Cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de baño.

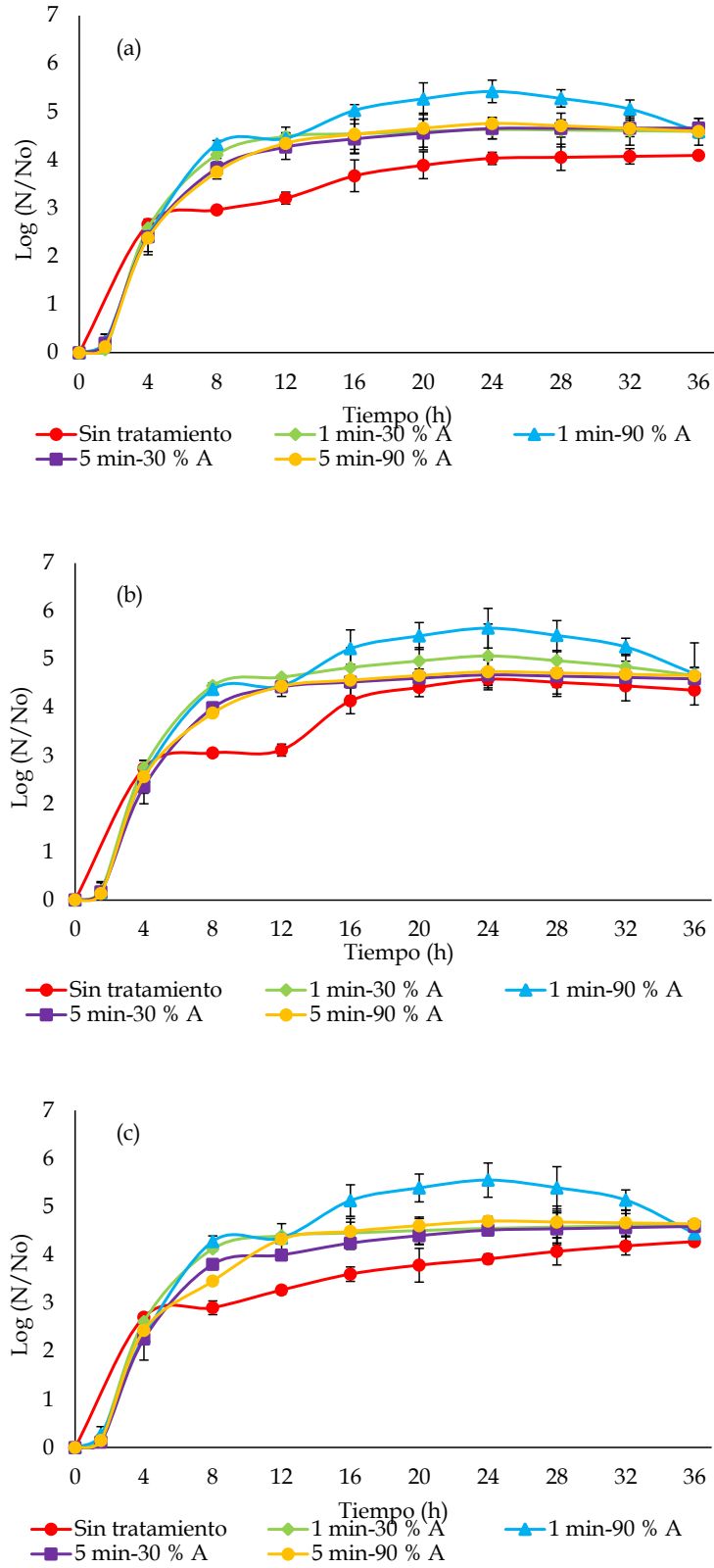


Figura 24. Cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de sonda.

3.10. Efecto el ultrasonido de potencia sobre los parámetros de crecimiento de *L. lactis* subsp. *lactis*

Se calcularon los parámetros de crecimiento de *L. lactis* subsp. *lactis* inoculado en los sistemas de leche tratada con US de baño, los datos se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}) y tiempo de duplicación (td) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en leche bovina sonicada con US de baño.

Sistema	Tiempo (min)	μ_{\max} (h ⁻¹)	td (h)
Parcialmente descremada	Sin tratamiento	1.54 ± 0.05 ^b	0.45 ± 0.01 ^{bc}
	10	1.64 ± 0.10 ^b	0.42 ± 0.03 ^{bc}
	30	1.38 ± 0.18 ^b	0.51 ± 0.06 ^b
	90	1.66 ± 0.01 ^b	0.42 ± 0.00 ^{bc}
Entera	Sin tratamiento	1.54 ± 0.00 ^b	0.45 ± 0.00 ^{bc}
	10	1.60 ± 0.08 ^b	0.44 ± 0.02 ^{bc}
	30	0.88 ± 0.04 ^c	0.79 ± 0.04 ^a
	90	1.95 ± 0.04 ^a	0.36 ± 0.01 ^c
Descremada	Sin tratamiento	1.54 ± 0.03 ^b	0.45 ± 0.01 ^{bc}
	10	0.92 ± 0.01 ^c	0.75 ± 0.01 ^a
	30	0.99 ± 0.09 ^c	0.71 ± 0.06 ^a
	90	1.99 ± 0.01 ^a	0.35 ± 0.00 ^c

Nota: Los valores dados son con una media n = 4 ± desviación estándar. Superíndices con letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p < 0.05) respecto al tiempo de tratamiento ultrasónico.

Los resultados de los parámetros de crecimiento indicaron que no hubo diferencia significativa (p>0.05) en cuanto al tipo de leche tratada con US, sin embargo, respecto a los tiempos utilizados, si hubo diferencia significativa (p<0.05). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* tuvo una velocidad de crecimiento mayor cuando se le aplicó tratamiento durante 90 min, y por lo tanto un menor tiempo de duplicación (0.35 h). De igual manera, se calcularon los parámetros de crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en los sistemas de leche tratada con US de sonda, en la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 9. Velocidad de crecimiento máxima (μ_{\max}) y tiempo de duplicación (td) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculado en leche bovina sonicada con US de sonda.

Sistema	Tiempo (min)	Amplitud (%)	μ_{\max} (h ⁻¹)	td (h)
Parcialmente descremada	Sin tratamiento	-	1.54 ± 0.05 ^{bb}	0.45 ± 0.01 ^{aA}
	1	30	2.28 ± 0.11 ^{aA}	0.31 ± 0.02 ^{bb}
	5	30	1.98 ± 0.05 ^{aA}	0.35 ± 0.01 ^{bb}
	1	90	2.26 ± 0.06 ^{aA}	0.31 ± 0.01 ^{bb}
	5	90	2.19 ± 0.07 ^{aA}	0.32 ± 0.01 ^{bb}
	Entera	Sin tratamiento	-	1.54 ± 0.00 ^{bb}
1		30	2.30 ± 0.03 ^{aA}	0.30 ± 0.00 ^{bb}
5		30	2.04 ± 0.01 ^{aA}	0.34 ± 0.00 ^{bb}
1		90	1.99 ± 0.05 ^{aA}	0.35 ± 0.01 ^{bb}
5		90	2.06 ± 0.03 ^{aA}	0.34 ± 0.01 ^{bb}
Descremada		Sin tratamiento	-	1.54 ± 0.03 ^{bb}
	1	30	2.18 ± 0.05 ^{aA}	0.32 ± 0.01 ^{bb}
	5	30	1.94 ± 0.04 ^{aA}	0.36 ± 0.01 ^{bb}
	1	90	1.82 ± 0.09 ^{aA}	0.39 ± 0.02 ^{bb}
	5	90	2.08 ± 0.04 ^{aA}	0.34 ± 0.07 ^{bb}

Nota: Los valores dados son con una media $n = 4 \pm$ desviación estándar. Superíndices con letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tiempo de tratamiento ultrasónico. Superíndices con letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a la amplitud.

Los resultados mostraron que no existió diferencia ($p > 0.05$) en la μ_{\max} y td de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cuando se aplica el tratamiento ultrasónico, sin embargo, si existió diferencia cuando es comparado con los parámetros de la bacteria que no recibió tratamiento. Por lo tanto, las condiciones que pudieran mantener los parámetros de crecimiento en algunas BAL como *Lactococcus lactis* serían tiempo de 1 min y la amplitud de 30%, debido a que son las condiciones donde mejor se adaptó la bacteria, teniendo un tiempo de duplicación en todas las leches de 0.30 h aproximadamente.

Los parámetros de crecimiento confirmaron que el US de sonda estimuló más el crecimiento de *L. lactis*, comparándolo con el US de baño, ya que presentó una velocidad de crecimiento máxima de $2.30 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$ y $1.99 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ respectivamente, además de que los tiempos de tratamiento son mucho más cortos.

Ojha et al. (2016) evaluaron la velocidad de crecimiento de *Lactobacillus sakei* al aplicarle US de sonda con las siguientes condiciones: 20 kHz, 29.7 W de potencia, durante 1 min, indicando que tuvo un valor de 0.27 h^{-1} , lo cual indica que la velocidad de crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es mayor que la reportada para *Lactobacillus* a las condiciones mencionadas.

3.11. Efecto del ultrasonido de potencia sobre la acidificación de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en los sistemas de leche.

Se determinó el perfil fermentativo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cuando es inoculado en leches con diferentes contenidos de grasa y tratada con ultrasonido de potencia. Como ya se mencionó, se utilizaron dos dispositivos ultrasónicos.

En las Figuras 25 y 26 se presentan los cambios de acidez (% de ácido láctico) y pH cuando *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es tratado con ultrasonido de baño e incubado durante 36 h.

En la Figura 25 se presenta un aumento de la producción de ácido láctico por parte de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cuando se aplica US de baño durante 90 min, teniendo un valor de $0.50\% \pm 0.03$ en leche entera después de 36 h de incubación; por otro lado, en la Figura 26 se observa una disminución del pH teniendo un valor de 5.58 ± 0.06 con leche entera después de 36 h, la disminución del pH se observó en todos los sistemas de leche. Por otra parte, se realizó el análisis de varianza de cambios de acidez y pH en sistemas de leche tratados con US de baño, los datos se presentan en la Tabla 10 y 11.

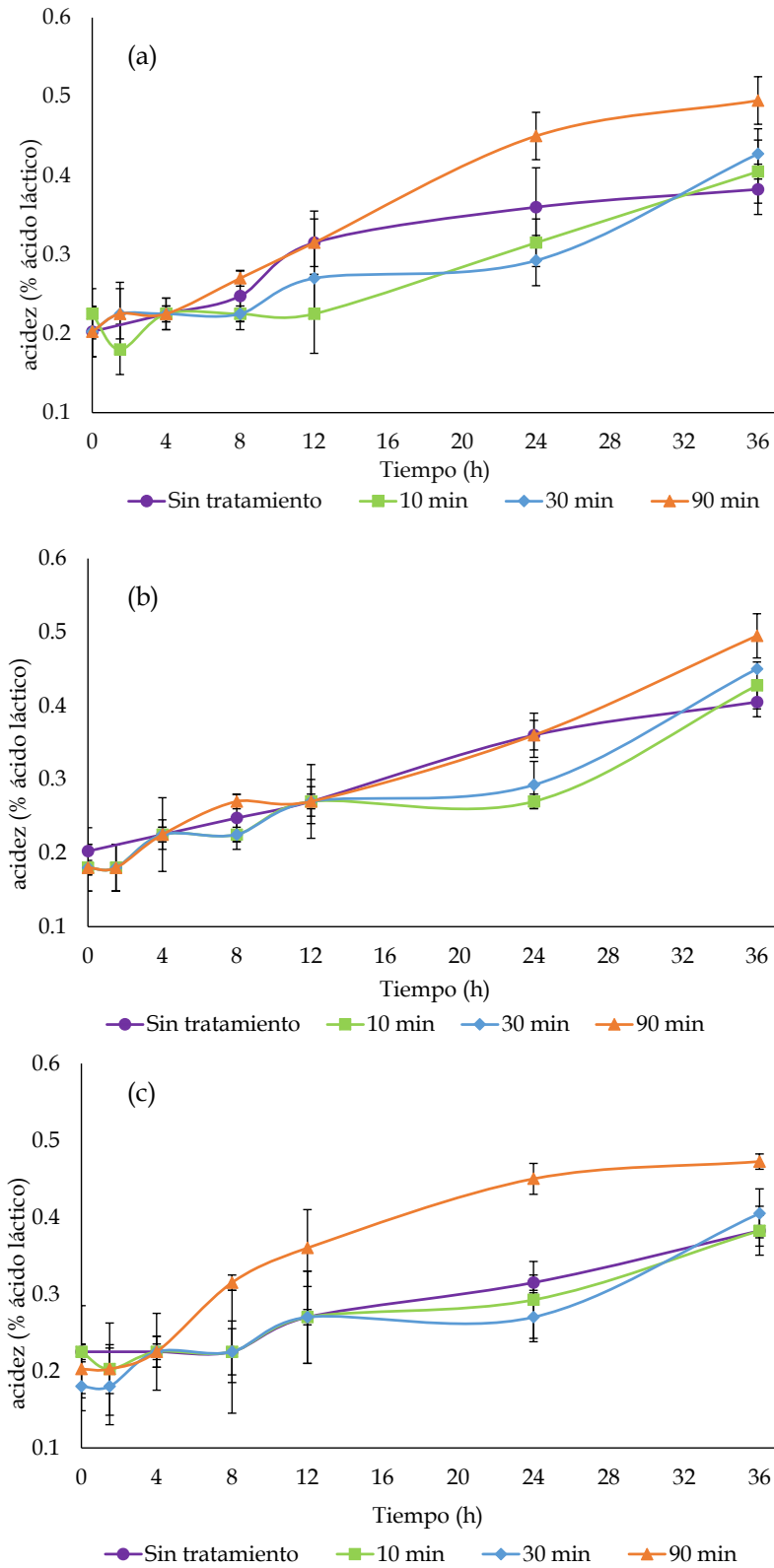


Figura 25. Cinética de acidificación (% de ácido láctico) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de baño.

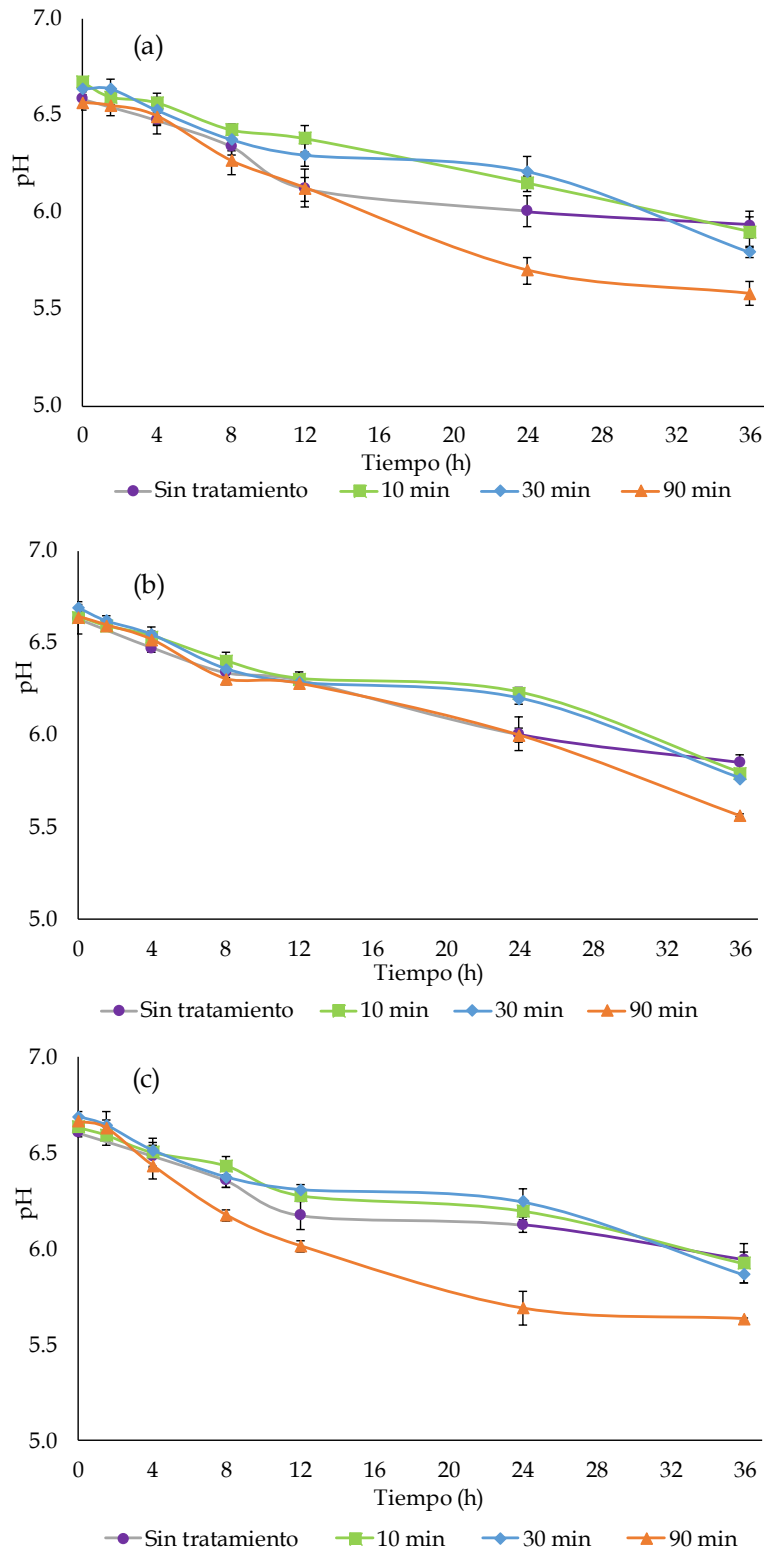


Figura 26. Cinética de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de baño.

Tabla 10. Análisis de varianza de cambios de acidez (% de ácido láctico) en los sistemas de leche inoculados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y sonicados con US de baño.

Variab les	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias cuadradas	Valor F	Valor P
Tipo de leche	0.006	2	0.003	4.620	0.032
Tiempo	0.036	3	0.120	17.83	0.000
Interacción	0.002	6	0.003	0.46	0.826
Error	0.008	12	0.007		
Total	0.052	23			

Tabla 11. Análisis de varianza de cambios de pH en sistemas de leche inoculados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y sonicados con US de baño.

Variab les	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medias cuadradas	Valor F	Valor P
Tipo de leche	0.043	2	0.021	38.940	0.000
Tiempo	0.380	3	0.127	232.620	0.000
Interacción	0.015	6	0.003	4.680	0.011
Error	0.007	12	0.001		
Total	0.445	23			

Los resultados de análisis de varianza indicaron que las variables independientes (tipo de leche y tiempo de tratamiento) tuvieron un cambio significativo ($p < 0.05$) sobre la producción de ácido láctico y pH, sin embargo, la interacción de ambas variables no afecta los parámetros de fermentación (acidez y pH) en leche inoculada con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

La cinética de acidificación y pH de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* utilizando US de sonda, se presenta en las Figuras 27 y 28.

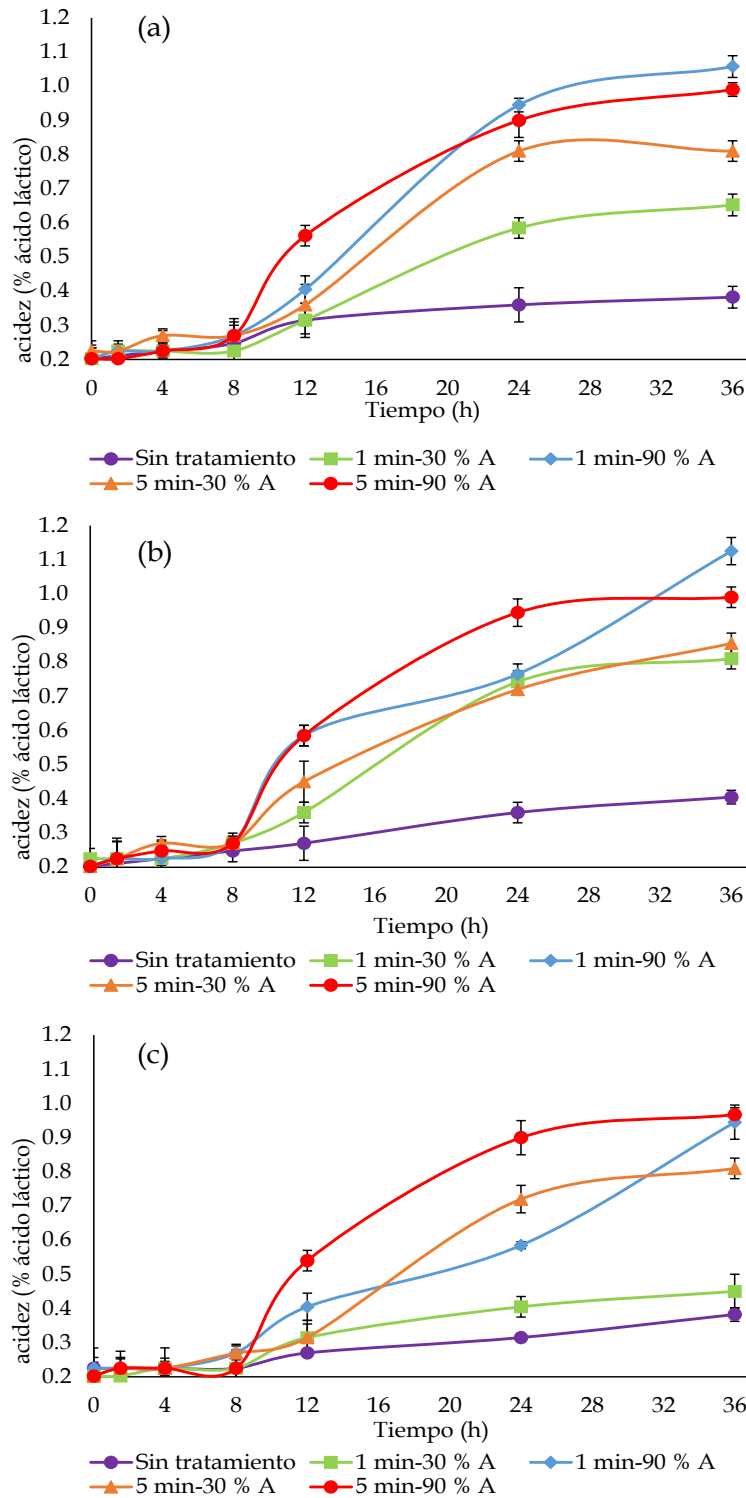


Figura 27. Cinética de acidificación (% de ácido láctico) de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de sonda.

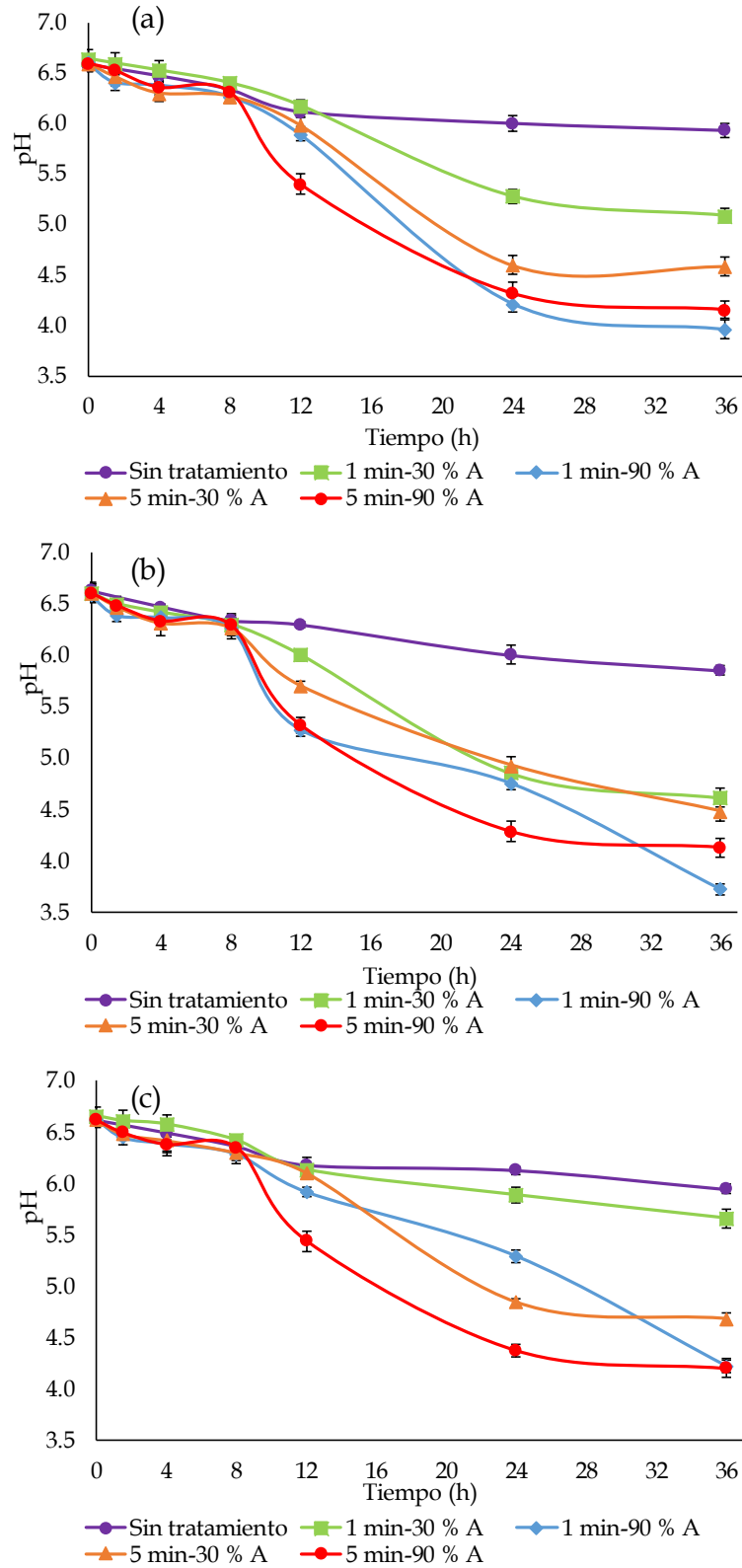


Figura 28. Cinética de pH de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche entera (a), parcialmente descremada (b), descremada (c) aplicando US de sonda.

Las cinéticas de acidez mostraron que hubo una mayor producción de ácido láctico al aplicar US de sonda, el cual tuvo un valor de $1.06\% \pm 0.03$ y $1.13\% \pm 0.04$ con la leche entera y descremada, respectivamente, y cuando se aplicó el tratamiento durante 1 min con una amplitud de 90%; por otro lado, el pH disminuyó hasta un valor de 3.96 ± 0.09 y 3.73 ± 0.05 en la leches entera y descremada con las mismas condiciones de tratamiento antes mencionadas.

Los resultados indicaron que existió una producción de ácido láctico mayor al utilizar US de sonda que cuando no se utiliza ningún tratamiento, ya que en leche descremada que es la que presenta un cambio menor, tuvo un valor de $0.38\% \pm 0.02$ sin sonicar y $0.95\% \pm 0.05$ con tratamiento de 1 min y 90% de amplitud, después de 36 h.

Wu et al. (2001) evaluaron el perfil fermentativo de BAL al aplicarles US de potencia, encontraron que *Bifidobacterium* inoculada en leche entera, tuvo un pH de 4.1 en un tiempo de 4.5 h de incubación, lo que es menor a lo reportado en este trabajo, ya que se obtuvo un pH de 6.39 ± 0.09 en leche entera tratada durante 1 min y 90% de amplitud e incubada durante 4 h. Esto indica que *L. lactis* tiene una fase de adaptación (Lag) más larga cuando se le aplica tratamiento ultrasónico, haciendo un aprovechamiento sustancial de los nutrientes (Ramírez *et al.*, 2011). En general, la disminución del pH en las muestras tratadas con US de potencia se atribuye a la disociación de las moléculas de agua producto de la sonólisis, la cual libera iones hidrógenos al medio ocasionando que este parámetro disminuya (Acuña *et al.*, 2015).

3.12. Efecto del ultrasonido de potencia sobre los componentes de la leche (grasa)

En la Figura 29 y 30 se observa el glóbulo de grasa de sistemas de leche, inoculados con *Lactococcus lactis subsp. lactis* aplicándoles tratamiento ultrasónico de baño y sonda.

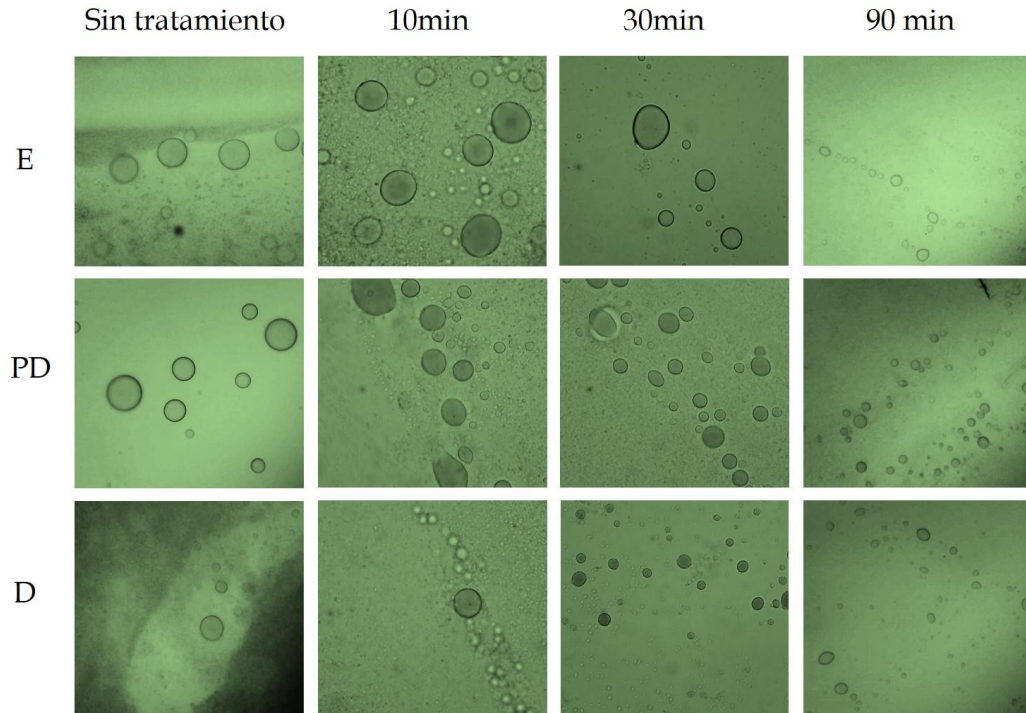


Figura 29. Micrografías (40x) de glóbulo de grasa de leches entera (E), parcialmente descremada (PD) y descremada (D), inoculadas con *L. lactis* subsp. *lactis* y tratadas con US de baño a diferentes tiempos (min).

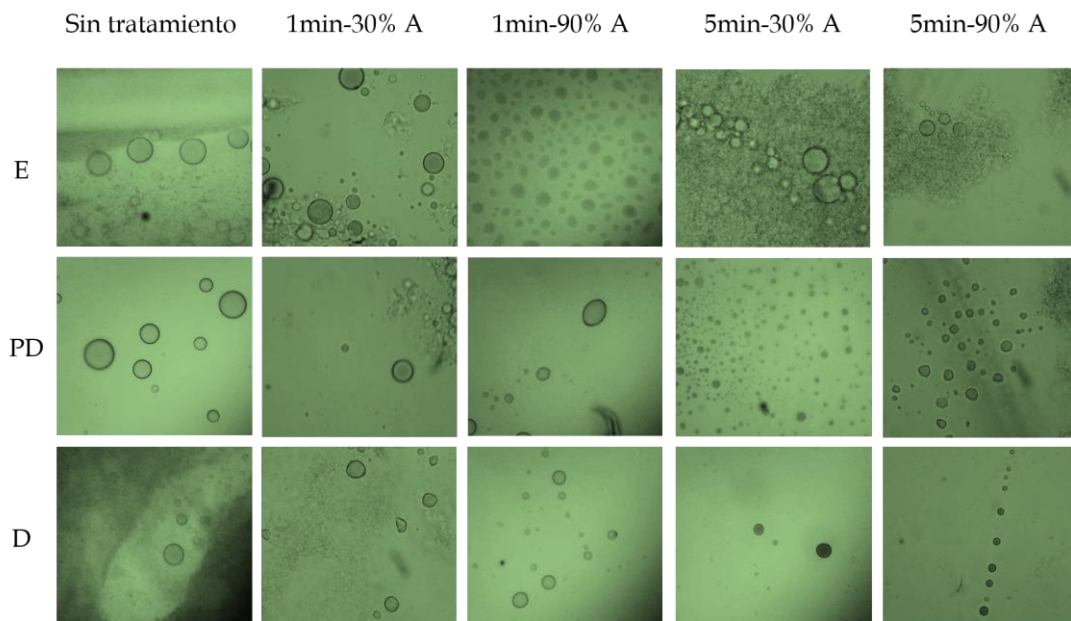


Figura 30. Glóbulo de grasa de leches entera (E), parcialmente descremada (PD) y descremada (D), inoculadas con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y tratadas con US de sonda a diferentes tiempos (min), mediante microscopio óptico a 40x.

El ultrasonido de potencia, ya sea de baño o sonda, provocó que el glóbulo de grasa disminuyera su tamaño, sobre todo a tiempos prolongados, también se observa que la potencia influye en él tamaño. Wu et al. (2001) reportaron que al utilizar US con 450 W de potencia, el glóbulo graso de leche entera disminuye su tamaño. Juliano et al. (2011) aplicaron US de potencia (400 kHz) en leche entera durante 120 s, concluyendo que la aplicación de US hace que los glóbulos de grasa disminuyan, provocando una mejor homogenización en la leche, sin embargo, esto depende del tiempo de tratamiento y la potencia aplicada. Por otro lado, Ertugay et al. (2004) reportaron que dependiendo de la potencia del US y los tiempos de exposición al tratamiento, la distribución de la grasa en leche entera aumenta.

Allam et al. (2017) reportaron que al utilizar *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la producción de queso, la grasa adicionada para su producción no tuvo cambios significativos ($p > 0.05$) cuando se obtuvo el producto final; por lo que esto indica que *L. lactis* no provocó cambios en los glóbulos de grasa presentes en los sistemas de leche.

3.13. Efecto del ultrasonido de potencia sobre el contenido de aminoácidos

La proteólisis, es la degradación que sufren las proteínas en compuestos de menor peso molecular, ésta puede ser provocada por la acción de enzimas las cuales secretan ciertos microorganismos; o por la hidrólisis que provocan algunas tecnologías (Guerrero *et al.*, 2003; Arzeni *et al.*, 2012). El contenido total de aminoácidos libres es un índice de proteólisis secundaria, y la leucina que es un aminoácido se considera un buen indicador de grado de proteólisis (Puchades *et al.*, 1989), por lo tanto, se empleó como referencia.

Se realizó la cuantificación de los aminoácidos libres presentes en los sistemas de leche inoculados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y sonificado con US de baño (Tabla 12), y se realizó un análisis de varianza con los datos obtenidos, los cuales se muestran en la Tabla 13.

Tabla 12. Aminoácidos libres (mg Leucina/mL de leche) en los sistemas inoculados con *Lacococcus lactis* subsp. *lactis* y tratados con US de baño.

Sistema	Tratamiento	mg Leucina/ mL de leche
	Tiempo (min)	
Parcialmente descremada	Sin tratamiento	5.40 ± 0.05 ^{bA}
	10	5.49 ± 0.10 ^{bA}
	30	6.30 ± 0.06 ^{bB}
	90	6.62 ± 0.03 ^{bB}
Entera	Sin tratamiento	5.30 ± 0.01 ^{aA}
	10	5.90 ± 0.53 ^{aA}
	30	7.04 ± 0.02 ^{aB}
	90	7.93 ± 0.19 ^{aB}
Descremada	Sin tratamiento	2.17 ± 0.01 ^{cA}
	10	2.34 ± 0.11 ^{cA}
	30	3.19 ± 0.01 ^{cB}
	90	3.20 ± 0.01 ^{cB}

Nota: Los valores dados son con una media $n = 4 \pm$ desviación estándar. Superíndices con letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tipo de leche. Superíndices con letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tiempo de tratamiento utilizado.

Tabla 13. Análisis de varianza de contenido de aminoácidos libres (mg Leucina/mL de leche) en los sistemas de leche, inoculados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y sonicados con US de baño.

Variable	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrada	Valor F	Valor P
Tipo de leche	67.559	2	33.779	1185.690	0.000
Tiempo	5.882	3	1.961	68.820	0.000
Interacción	6.324	6	1.054	36.990	0.000
Error	0.342	12	0.029		
Total	80.105	23			

Los resultados de la Tabla 13 indicaron que el tipo de leche y tiempo de sonicación tuvieron un cambio significativo ($p < 0.05$) sobre la cantidad de aminoácidos libres después del tratamiento con US de baño, así mismo, la interacción de estas variables tuvo efecto sobre este parámetro; teniendo un contenido de aminoácidos libres de 5.40 ± 0.05 a 6.62 ± 0.03 en leche parcialmente descremada; 5.30 ± 0.01 a 7.93 ± 0.19 en leche entera; de 2.17 ± 0.01 a 3.20 ± 0.01 en leche descremada, después de 90 min de tratamiento; lo que indica que el US de baño provocó una hidrólisis de las proteínas al aumentar el contenido de a.a libres (Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2009).

La Tabla 14 se presenta el contenido de aminoácidos libres en los sistemas de leche después del tratamiento realizado con US de sonda. Los resultados mostraron que a mayor amplitud y tiempo de tratamiento con el US de sonda existió mayor contenido de aminoácidos libres, sin embargo, el calor generado durante el tratamiento también es un factor a tomar en cuenta. Esto coincide con Shanmugam *et al.* (2012) quienes reportan que, al utilizar US de potencia con una frecuencia de 20 kHz, una amplitud del 100 %, durante un periodo de tiempo de 15-60 min en leche descremada existió una desnaturalización de proteínas provocando proteólisis, sin embargo, este dato no indica que se deba al tiempo o frecuencia utilizado con el US, ya que la proteólisis muchas veces se debe al calor generado durante el tratamiento.

Tabla 14. Aminoácidos libres (mg Leucina/mL de leche) en los sistemas inoculados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y tratados con US de sonda.

Sistema	Tratamiento		mg Leucina/ mL de leche
	Tiempo (min)	Amplitud (%)	
Parcialmente descremada	Sin tratamiento	-	5.49 ± 0.10 ^{bB}
	1	30	2.22 ± 0.04 ^{bA}
	5	30	4.48 ± 0.01 ^{bA}
	1	90	5.22 ± 0.26 ^{bB}
	5	90	6.91 ± 0.20 ^{bB}
Entera	Sin tratamiento	-	7.04 ± 0.02 ^{aB}
	1	30	2.97 ± 0.09 ^{aA}
	5	30	10.93 ± 0.06 ^{aC}
	1	90	7.15 ± 0.08 ^{aB}
	5	90	11.92 ± 0.05 ^{aC}
Descremada	Sin tratamiento	-	2.17 ± 0.01 ^{cA}
	1	30	1.74 ± 0.00 ^{cA}
	5	30	1.23 ± 0.02 ^{cA}
	1	90	2.24 ± 0.12 ^{cA}
	5	90	2.76 ± 0.06 ^{cA}

Nota: Los valores dados son con una media $n = 4 \pm$ desviación estándar. Superíndices con letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tipo de leche. Superíndices con letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al tiempo de tratamiento utilizado.

Asimismo, Ding et al. (2017) reportó el cambio que existe en los aminoácidos de un sistema modelo después de aplicar ultrasonido de potencia con las siguientes características: 150 W de potencia, 30 kHz de frecuencia, durante 20 min, y reportó que los aminoácidos presentaron un ligero aumento en su contenido (0.163 μg de aminoácido/mL muestra) después del tratamiento ultrasónico. Lo cual indica que, aunque el US provoca un ligero cambio en el contenido de aminoácidos, el calor

generado por el tratamiento también está influenciando los valores obtenidos (Walstra *et al.*, 2006). Por otro lado, Allam *et al.* (2017) reportaron que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inoculada en leche entera, provocó el aumento del % de la proteína presente en la leche, después de 10 días. Al igual que Ziadi *et al.* (2010) que realizó un estudio para conocer el catabolismo de aminoácidos por *Lactococcus lactis* durante la fermentación de la leche y encontró que la leucina aumentó (131 mg) al momento de ocurrir la fermentación provocada por la bacteria. Esto nos indica que tanto *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como el calor generado por el ultrasonido, está teniendo un efecto sobre la cantidad de aminoácidos libres presentes en las muestras de leche.

CONCLUSIONES

- El queso adobera es un producto artesanal con una cantidad alta de bacterias ácido lácticas; más de 23 cepas se aislaron en este proyecto.
- La identificación de bacterias ácido lácticas por medio de PCR mostró dos géneros importantes de BAL *Enterococcus* y *Lactococcus*, siendo las especies *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, las de mayor presencia.
- Respecto al perfil fermentativo y crecimiento de BAL identificadas, las cepas de *Enterococcus faecium* y la reportada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* mostraron una población y una producción de ácido láctico alto, sin embargo, su velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación no mostraron diferencia significativa ($p>0.05$), por lo que se considera que pueden estar relacionadas con los atributos sensoriales otorgados en la producción de queso adobera.
- El uso de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en el proceso de aplicación de US estuvo relacionada con su crecimiento poblacional y su capacidad de crecimiento a 37°C.
- Respecto a la aplicación de US de baño, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aumentó su población y producción de ácido láctico cuando es inoculada en sistemas de leche parcialmente descremada y aplicando tratamientos de 90 min.
- La aplicación del ultrasonido de sonda generó una estimulación del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en todos los sistemas de leche, sin embargo, se presentó mayor crecimiento en leche parcialmente descremada y condiciones de 1 min y 90% de amplitud. Las cinéticas de acidez mostraron que hubo una mayor producción de ácido láctico en leche entera y descremada.
- Los parámetros cinéticos mostraron que no existió diferencia ($p>0.05$) en la μ_{max} y t_d de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cuando se le aplica tratamiento ultrasónico, sin embargo, si existió diferencia cuando es comparado con los parámetros de la bacteria que no recibió tratamiento.
- Ambos tipos de ultrasonidos (sonda y baño) generaron que el glóbulo graso de la leche disminuyera su tamaño, lo que puede incrementar el potencial lipolítico de la muestra.

- Los aminoácidos libres presentes en los sistemas de leche inoculados con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aumentaron al aplicarse el US de potencia (baño y sonda), mostrando que existió diferencia significativa de acuerdo con la leche y al tiempo utilizado, sin embargo, el calor generado durante el tratamiento es un factor que influyó en los resultados.

RECOMENDACIONES

- Establecer un diseño de experimentos para optimizar las condiciones de operación del US de potencia.
- Se recomienda evaluar la capacidad probiótica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de queso adobera comercial, para darle un valor agregado al microorganismo en estudio.
- Evaluar el tamaño del glóbulo de grasa mediante microscopia electrónica de barrido para determinar con mayor precisión el efecto del US de potencia.
- Realizar la técnica de HPLC para conocer si hay una afectación sobre las proteínas, así como del tipo de ácidos grasos de la leche.
- Evaluar el efecto del US de potencia en leche inoculada con la cepa 12, la cual creció a 28 °C que es la temperatura a la que se elabora el queso adobera.
- Evaluar el efecto del US de potencia con otros géneros de BAL, por ejemplo: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*
- Usar modelos o ecuaciones matemáticas para el ajuste de datos de crecimiento microbiano (Gompertz, Logístico, entre otros).

REFERENCIAS

Acuña, N. T., Castro, A. D. y Porras, O. O. (2015). Efecto de la aplicación de ondas de ultrasonido de alta potencia sobre las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del músculo semitendinoso longissimus de la especie bovina. *Revista de Investigaciones Universidad del Quindío*, 27(1), 120-126.

Adamberg, K., Kask, S., Laht, T. M. y Toomas, P. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 171-183.

Adib, A. y Bertrand, S. (2009). Risk analysis transfer pesticides to milk. Institute of Livestock. National Interprofessional Centre, 9.

Agudelo, G. D. A. y Bedoya, M. O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 38-42.

Agudelo, C., Ortega, R. y Hoyos, J. L. (2010). Determination of kinetic parameters of two lactic inoculums: *Lactobacillus plantarum* A6 and lactic acid bacterias of yogurt. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(2), 11-15.

Ahmad, A. y Ahmad, R. (2017). In-gel detection of esterase-like albumin activity: Characterization of esterase-free sera albumin and its putative role as non-invasive biomarker of hepatic fibrosis. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 673-682.

Alais, C. (2000). Il lattosio. Fisica e fisico-chimica de latte. Le proteine del siero. *En: Scienza del latte (3a edition)*. Millano: Techniche Nuove, 312-320.

Ali, L., Spiess, M., Wobser, D., Rodríguez, M., Blum, H. E. y Sakinç, T. (2016). Identification and functional characterization of the putative polysaccharide

biosynthesis protein (CapD) of *Enterococcus faecium* U0317. *Infection, Genetics and Evolution*, 37, 215-224.

Allam, M. G. M., Darwish, A. M. G., Ayad, E. H. E., Shokery, E. S. y Darwish, S. M. (2017). *Lactococcus* species for conventional Karish cheese conservation. *LWT Food Science and Technology*, 79, 625-631.

Amiot, J., Fournier, F., Lebeuf, Y., Paquin, P. y Simpson, R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologiques, et techniques d'analyse du lait. *Dans: science et technologie du lait: transformation du lait*. Montréal: Presses internat ionales polytechnique, 45-49.

AOAC. Association of official analytical chemists. (2000). *The Official Methods of Analysis*.

Arshadi, M., Douraghi, M. y Shokoohizadeh, L. (2017). High prevalence of diverse vancomycin resistance *Enterococcus faecium* isolates in clinical and environmental sources in IC wards in southwest of Iran. *Microbial Pathogenesis*, 111, 212-217.

Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E. y Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108, 463-472.

Ashokkumar, M., Lee, J., Kentish, S. y Grieser, F. (2007). Bubbles in an acoustic field: an overview. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 470-475.

Bachmann, H., de Wilt, L., Kleerebezem, M. y van Hylckama Vlieg, J.E. (2010). Time-resolved genetic responses of *Lactococcus lactis* to a dairy environment. *Environment Microbiology*, 12(5), 1260-1270.

Barbosa-Cánovas, G. V. y Sepúlveda, D. (2004). Present status and the future of PEF technology. *Novel Food Processing Technologies*, 1, 2-40.

Barbosa-Cánovas, G. V. y Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos. *Scientia Agropecuaria*, 1, 81-93.

Bendicho, C., De la Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N. y Lavilla, I. (2012). Ultrasound assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31, 50-60.

Bermúdez-Aguirre, D. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2008). Study of buffer fat content in milk on the inactivation of *Listeria innocua* ATCC 51742 by thermo-sonication. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 176-185.

Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., Versteeg, K., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Composition parameters, physical-chemical characteristics and shelf-life of whole milk after thermal and thermo-sonication treatments. *Journal of Food Quality*, 32, 283-302.

Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.

Cavanagh, D., Fitzgerald, G. y McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45-51.

Cervantes, F., Villegas, A. y Cesin, A. (2008). Los quesos mexicanos genuinos/Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mundi Prensa México.

Chandrapala, J., Zisu, B., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2012). The effects of high-intensity ultrasound on the structural and functional properties of α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin and their mixtures. *Food Research International*, 48, 940-943.

Chartterton, D., Smithers, G., Roupas, P. y Brodkorb, A. (2006). Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16(11), 1229-1240.

Cheigh, C. I., Choi, H. J., Park, H., Kim, S. B., Kook, M. C., Kim, T. S., Hwang, J. K. y Pyun, Y. R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, 95, 225-230.

Collado, A. M. C. (2005). Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico. *Tesis doctoral*. Universidad Politécnica de Valencia.

Condón, S., Raso, J. y Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by ultrasound. *Novel Food Processing Technologies*, 423-442.

Cullen, P., Tiwari, B. K. y Valdramidis, V. (2012). *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods (Primera Edition)*. Estados Unidos de América: Academic Press, 112-121.

Dahlem, O., Demaiffe, V., Halloin, V. y Reisse, J. (1998). Direct sonication system suitable for medium-scale sonochemical reactors. *AIChE Journal*, 44(12), 2724- 2730.

Dahroud, B. D., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Hamishehkar, H., Bialvaei, A. Z., Yousefi, M. y Kafil, H. S. (2016). Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 462-467.

Davidson, P. y Hoover, D. (1993). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria*. Salminen S.; Von Wright A (Eds). San Diego, California: Academic Press, 96-114.

Da Silva, F. F. P., Biscola, V., Guy, L. J. y Gombossy, M. F. B. D. (2016). Effect of indigenous lactic acid bacteria isolated from goat milk and cheeses on folate and riboflavin content of fermented goat milk. *LWT Food Science and Technology*, 71, 155-161.

De Boer, A., Urlings, M. J. E. y Bast, A. (2016). Active ingredients leading in health claims on functional foods. *Journal of Functional Foods*, 20, 587-593.

De Kruif, C. G. (2003). Caseins. En: *Progress in Biotechnology*, volume 23. (Eds) Elsevier Science, Londres, 219-230.

Delgado, J. O. (2011). Aplicación del ultrasonido en la industria de los alimentos. *Revista especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 6, 142-147.

Demidróvel, A. y Baysal, T. (2009). The use of ultrasound and combined technologies in food preservation. *Food Reviews International*, 25, 1-11.

Devlieghere, F., Vermeiren, L. y Debevere, J. (2004) New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285.

Ding, Q., Zhang, T., Cao, F., Wu-Chen, R. A., Luo, L. y Ma, H. (2017). Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 245-251.

Dupont, D., Grappin, R., Pochet, S. y Lefier, D. (2011). Milk proteins: Analytical methods. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, California: Elsevier, 741-743.

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 and Animal Sciences*, 28, 303-308.

Fairbairn, D. y Law, B. (1986). Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. *Journal of Dairy Research*, 53, 139-177.

Faría, R. J. F., García, U. A., García, A. y Tovar, V. A. (2000). Eficiencia de la pasteurización de la leche de cabra en una miniplanta procesadora de queso. *Revista científica, FCV-LUZ*, 2, 119-123.

Farrell, H. M. (2011). Casein Nomenclature, structure and association. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, California: Elsevier, 765-769.

Fernández-Molina, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, G. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. *Revista Arbor*, 155-170.

Fillion, M. M. (2006). Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. *Thèse*, 23-447.

Florence, C. L. (2010). Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras, voies d'amélioration par l'alimentation. *Ecole nationale vétérinaire d'ALFOR, thèse*. Doctorat vétérinaire, 51.

Fox, Guinee, T., Cogan, T. y McSweeney, P. L. H. (2000). *Fundamentals of Cheese Science*. Estados Unidos de America: Springer US, 213-217.

Fox, P. F. y Kelly, A. L. (2004). The caseins. *En: Proteins in Food Processing*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 49-61.

Fox, P. F. y Brodkord, A. (2008). The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal*, 18, 677-684.

Fuentes, F. M., Londoño, Z. A., Durango, Z. M., Gutiérrez, B. M., Ochoa, A. S. y Sepúlveda, V. J. (2017). Antimicrobial capacity of native lactic acid bacteria isolated from double cream cheese and colombian quesillo. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 49-53.

Fuquay, J. W., Fox, P. F. y McSeeney, P. L. H. (2011). Lipid oxidation. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, California: Elsevier, 716-719.

Gallegos, J., Arce, C., Jordano, R., Arce, L. y Medina, L. M. (2017). Target identification of volatile metabolites to allow the differentiation of lactic acid bacteria by gas chromatography-ion mobility spectrometry. *Food Chemistry*, 220, 362-370.

García-Garibay, M. y López, M. A. (2004). *Bioteología alimentaria. Productos lácteos*. México: Editorial Limusa-Grupo Noriega Editores, 107-118.

Gómez-Díaz, J. y López-Malo, A. (2009). Aplicaciones del ultrasonido en el tratamiento de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 59-73.

González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, A. M., De la Rosa-Alcaraz, M. A., Hernández-Mendoza, A. y Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican chesses. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3252-3255.

Guerrero, L., Román, S. y Pacheco, L. (2003). Proteólisis de la leche cruda almacenada en frío. Efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 13(3), 187-192.

Guetouache, M., Guessas, B. y Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2(10), 115-122.

Hani, N. M., Torkamani, A. E., Abidin, S. Z., Mahmood, W. A. K. y Juliano, P. (2017). The effects of ultrasound assisted extraction on antioxidative activity of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using response surface approach. *Food Bioscience*, 17, 7-16.

Hernández-Mendoza, A., Robles, V. J., Angulo, J. O., De La Cruz, J. y García, H. S. (2007) Preparation of a whey-bases probiotic product with *Lactobacillus reuteri* and *Bifidobacterium bifidum*. *Journal Food Technology Biotechnological*, 45(1), 27-31.

Hernández-Rojas, M. y Vélez-Ruíz, J. F. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de productos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13-22.

Higuera-Ciapara, I. (1986). Small-scale cheesemaking of Latin American cheeses. Cheese-makers. *The sensory Evaluation of Dairy Products*, 23, 4-10.

Hill, C., Okeeffe, T. y Ross, P. (2002). Antimicrobial factors produced by lactic acid bacteria. *Encyclopedia of Food Sciences and nutrition*, 45, 27-31.

Hui, Y. (1993). *Dairy Science and Technology Handbook, Product Manufacturing*, Washington: VCH publishers, 2, 121.

Hunter, G., Lucas, M., Watson, I. y Parton, R. (2008). A radial mode ultrasonic horn for the inactivation of *Escherichia coli* K12. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2), 101-109.

Hussain, M. A., Rouch, D. A. y Britz, M. L. (2009). Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *International Dairy Journal*, 19(1), 12-21.

Jay, J. M. (2000). *Microbiología moderna de los alimentos. 4a edición*. Zaragoza, España. Acribia, 106-108.

Jiménez, S. A. (2009). Efectos de diferentes fármacos sobre el crecimiento de *L. casei*. *Tesis para obtener el grado de Doctorado en ciencias con especialidad en alimentos*. Instituto Politécnico Nacional.

Jiménez-Espinoza, S., Estarrón-Espinosa, M., Kirchmayr, M.R., Lugo-Cervantes, E. C., Villanueva-Rodríguez, S. J. y García-Parra, M. D. (2017). Biotransformación del ácido linoleico (AL) en ácido linoleico conjugado (CLA) por bacterias lácticas nativas de queso adobera artesanal del estado de Jalisco. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2, 148-154.

Juliano, P., Kutter, A., Cheng, L. J., Swiergon, P., Mawson, R. y Augustin, M. A. (2011). Enhanced creaming of milk fat globules in milk emulsions by the application of ultrasound and detection by means of optical methods. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 963-973.

Kazachek, M. V. y Gordeychuk, T. V. (2009). Estimation of the cavitation peak pressure using the Na D-line structure in the sonoluminescence spectra. *Technical Physics Letters*, 35(2), 193-196.

Kazeem, M. I. y Davies, T. C. (2016). Anti-diabetic functional foods as sources of insulin secreting, insulin sensitizing and insulin mimetic agents. *Journal of Functional Foods*, 20, 122-138.

Kentish, S. y Feng, H. (2014). Applications of Power Ultrasound in Food Processing. *Food Science and Technology*, 5, 263-284.

Kim, W. S., May, R. J. y Dunn, N. W. (1997). The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 48(4), 449-453.

Kim, W. S., Ren, J. y Dunn, N. W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 171(1), 57-65.

Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. y Lee, D. U. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 15(5), 261-266.

Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A. R., Herceg, Z. y Brnčić, S. R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 87(1), 64-73.

Larsen, N., Moslehi-Jenabian, S., Werner, B. B., Jensen, M. L., Garrigues, C., Vogensen, F. K. y Jespersen, L. (2016). Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 5-12.

Le Roux, Y., Colin, O. y Laurent, F. (1995). Proteolysis in samples of quarter milk with somatic cell counts. 1. Comparison of somatic indicators of endogeneous proteolysis in milk. *Journal of Dairy Science*, 78, 1289-1297.

Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H. y Martin, S. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: microbial responses and kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, 93(3), 354-364.

Leong, T., Ashokkumar, M. y Kentish, S. E. (2011). The fundamentals of power ultrasound: a review. *Acoustics Australia*, 39(2), 43-52.

Leroy, F., Degeest, B. y De Vust, L. A. (2002). A novel área of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganism in foods. *International Journal Food Microbiology*, 73(2-3), 251-259.

López-Díaz, A. S., Palou, E. y López-Malo, A. (2012). Radiación ultravioleta en jugos de frutas: fundamentos y aplicaciones. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 79-93.

Luo, J., Wang, Z. W., Wang, F., Zhang, H., Lu, J., Guo, H. Y. y Ren, F. Z. (2014). Cryo-SEM images of native milk fat globule indicate small casein micelles are constituents of the membrane. *RSC Advances*, 4, 963-966.

Ly, M. H., Covarrubias-Cervantes, M., Dury-Brun, C., Bordet, S., Voilley, A., Le, T.M., Belin, J. M. y Waché, Y. (2008). Retention of aroma compounds by lactic acid bacteria in model food media. *Food Hydrocolloids*, 22(2), 211-217.

MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Argentina, Editorial Médica Panamericana, 600-607.

Mandigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. y Clark, D. P. (2009). *Brock biología de los microorganismos (14a Edition)*. Editorial PEARSON, 909-913.

Mason, T. J. (1999). Sonochemistry: current uses and future prospects in the chemical and processing industries. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 355-369.

Mason, T. J. y Lorimer, J. P. (2002). *Applied Sonochemistry: The Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*. Darmstadt, Germany: Wiley-VCH, 88-93.

Mason, T. J., Riera, E., Vercet, A. y López-Buesa, P. (2005). Application of ultrasound. In: D. Sun (Ed). *Emerging technologies for food processing*, 323-351.

Mäyrä-Mäkinen, A. y Bigret, M. (1993). Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: Salminen S.; Von Wright A. (Eds) *Lactic Acid Bacteria*. San Diego, California: Academic Press, 2, 65-95.

Miles, A. A. y Misra, S. S. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of hygiene*, 732-749.

Miller, G. D. (2007). The importance of milk and milk products in the diet. *Handbook of dairy foods and nutrition (3rd edition)*, Boca Ratón, Florida: CRC Press, 105-111.

Morandi, S., Milena, B., Alfieri, P. Lodi, R. y Tamburini, A. (2005). Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Lait*, 181-192.

Morandi, S., Milena, B., Andrighetto, C., Lombardi, A. y Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal*, 16, 867-875.

Mulet, A., Benedito, J., Bon, J. y San Juan, N. (1999). Revisión: Ultrasonidos de baja intensidad en tecnología de alimentos. *Food Science and Technology International*, 5(4), 285-297.

Mulet, A., Carcel, J. A., Bon, J. y San Juan, N. (2003). New food drying technologies- Use of ultrasound. *Food Science and Technology International*, 215-221.

Ng-Kwai-Hang, K. F. (2011). Heterogeneity, Fractionation, and Isolation. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. San Diego, California: Elsevier, 751-756.

Nguyen, T. M. P., Lee, Y. K. y Zhou, W. (2009). Stimulating fermentative activities of bifidobacteria in milk by high intensity ultrasound. *International Dairy Journal*, 19(6-7), 410-416.

Nomura, M., Kobayashi, M., Ohmomo, S. y Okamoto, T. (2000). Inactivation of the Glutamate Descarboxylase Gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2235-2237.

Norma Mexicana. NMX-F-444-1983, Alimentos- Yogurt o leche búlgara. Modificación aprobada por el mismo Comité e integrado en el Suplemento al Programa Nacional de Normalización 2002. DOF 30 Sep 2002.

Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Norma Oficial Mexicana. NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

O'Mahony, J. A., Lucey, J. A. y McSweeney, P. L. H. (2005). Chymosin-mediated proteolysis, calcium solubilization, and texture development during the ripening of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3101-3114.

Ohlsson, J. A., Johansson, M., Hansson, H., Abrahamson, A., Byberg, L., Smedman, A., Lindmark-Månsson, H. y Lundh, Å. (2017). Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products. *International Dairy Journal*, 73, 151-154.

Ojha, K. S., Kerry, J. P., Alvarez, C., Walsh, D. y Tiwari, B. K. (2016). Effect of high intensity ultrasound on the fermentation profile of *Lactobacillus sakei* in a meat model system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 539-545.

Ojha, K. S., Mason, T. J., O'Donnell, C. P., Kerry, J. P. y Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound technology for food fermentation applications. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 410-417.

Olivera, J. (2011). Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de leche. *Unidad de Tecnología de Alimentos, Universidad de la República*, 29-45.

Parra, H. R. A. (2010). Review Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Revista de Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.

Pascale, S. M. G., Chervaux, C., Smokvina, Ehrlich, D. S. y Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Leuvenhock*, 82(1-4), 187-216.

Patil, S., Bourke, P., Cullen, B., Frias, J. M. y Cullen, P. J. (2009). The effects of acid adaptation on *Escherichia Coli* inactivation using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10(4), 486-490.

Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.

Puchades, R., Lemieux, L. y Simard, R. E. (1989). Evolution of Free Amino Acids during the Ripening of Cheddar Cheese Containing Added Lactobacilli Strains. *Journal Food Science*. 54(4), 885-888.

Racioppo, A., Corbo, M. R., Piccoli, C., Sinigaglia, M., Speranza, B. y Bevilacqua, A. (2017). Ultrasound attenuation of lactobacilli and bifidobacterial: Effect on some technological and probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 78-83.

Raharintsoa, C., Gaulard, M. L. y Alais, C. (1978). Effet des ultrasons cavitants sur la coagulation du lait par les enzymes. *Le lait*, 58, 579-580.

Ramírez, H. A. (2010). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (A. salmiana) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Tesis de maestría del Instituto Politécnico Nacional*.

Ramírez, J. C. R., Ulloa, P. R., González, V. M. Y., Ulloa, J. A. y Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7, 2-7.

Ramírez-López, C. y Vélez-Ruíz, J. F. (2012). Quesos frescos: propiedades de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 131-148.

Ramírez-López, C. y Vélez-Ruíz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información Tecnológica*, 27(6), 115-128.

Raso, J., Pagán, R., Condón, S. y Sala, F. J. (1998). Influence of temperatura and pressure on the lethality of ultrasound. *Applied and Evironmental Microbiology*, 64(2), 465-471.

Raso, J. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 265-285.

Ray, P. R., Chatterjee, K., Chakraborty, C. y Ghatak, P. K. (2013). Lipolysis of milk: a review. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 1(1), 59-66.

Reglamento de Control Sanitario. Diario Oficial de la Federación. DOF Reglamento de control sanitario de productos y servicios. 9 Ago de 1999.

Ried, K. (2004). Gastrointestinal health the role of pro- and pre-biotics in standard foods. *Clinical Practice*, 33(4), 253-255.

Robles-Ozuna, L.E y Ochoa-Martínez, L.A. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de los alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología y Postcosecha*, 13(2), 109-122.

Rodríguez, E., Calzada, J., Arques, J. L., Rodríguez, J. M., Nuñez, M. y Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157: H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15(1), 51-57.

Ruvalcaba, G. J. M., Delgado, M. R. J., Ruiz, E. H., López, G. V. y Méndez, R. M. D. (2011). Caracterización de las prácticas de ordeño y calidad higiénico-sanitaria de leche en dos municipios de los Altos de Jalisco. In XII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. Puerto Vallarta, Jalisco. México: Universidad de Guadalajara.

Sahingil, D., Hayaloglu, A. A., Simsek, O. y Ozer, B. (2014). Changes in volatile composition, proteolysis and textural and sensory properties of white-brined cheese: effects of ripening temperature and adjunct culture. *Dairy Science & Technology*, 94(6), 603-623.

Salleh-Mack, S. y Roberts, J. (2007). Ultrasound pasteurization: The effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(3), 323-329.

Sarantinopoulos, P., Makras, L., Vaningelgem, F., Kalantzopoulos, G., Vuyst, L. D. y Tsakalidou, E. Growth and energy generation by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 during citrate metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 197-206.

Schlimme, E. y Buchheim, W. (2002). Proteínas lácteas: caseínas, proteínas del suero y proteínas minoritarias en la leche y sus componentes. Propiedades químicas y físicas. Zaragoza, España: Acribia, 53-65.

Shanmugam, A., Chandrapala, J. y Ashokkumar, M. (2012). The effect of ultrasound on the physical and functional properties of skim milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 251-258.

Singh, T. K. y Heldman, D. R. (2009). *Introduction to Food Engineering (Cuarta edición)*. Estados Unidos de América: Academic Press, 187-191.

Sivakumar, M. y Pandit, A. B. (2001). Ultrasound enhanced degradation of Rhodamine B: optimization with power density. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 233-240.

Smit, G., Smit, B. A. y Engels, W. J. M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 591-610.

Sochard, S., Wilhelm, A. M. y Delmas, H. (1997). Modeling of free radicals production in a collapsing gas-vapor bubble. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4, 77-84.

Soria, A. C. y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: Review. *Food Science Technology*, 21(7), 323-331.

- Souza, E. C., Oliveira, S. A. P., Domínguez, J. M., Converti, A. y Souza, O. R. P. (2017). Influence of temperatura and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *Journal of Food*, 15(4), 525-530.
- Steele, J., Broadbent, J. y Kok, J. (2013). Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavor development. *Current Opinion of Biotechnology*, 24(2), 135-141.
- Sutkar, V. S. y Gogate, P. R. (2009). Design aspects of sonochemical reactors: Techniques for understanding cavitational activity distribution and effect of operating parameters. *Chemical Engineering Journal*, 155(1-2), 26-36.
- Tabatabaie, F. y Mortazavi, A. (2008). Studying the effects of ultrasound shock on cell wall permeability and survival of some LAB in milk. *World Applied Sciences Journal*, 3(1), 119-121.
- Tamay, D. L., Ibarra, C. y Valsequillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud*, 2(2), 74-78.
- Torkamani, A. E., Juliano, P., Ajlouni, S. y Singh, T. K. (2014). Impact of ultrasound treatment on lipid oxidation of Cheddar cheese whey. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 951-957.
- Torres-Llanez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A. y González-Córdova, A. F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal mexican fresco cheese. *Food Control*, 17, 683-890.
- Trujillo, A. J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R. y Guamis, B. (2002). Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: A review. *Innovate Food Science and Emerging Technologies*, 3, 295-307.

Tsukamoto, I., Constantinoiu, E., Furuta, M., Nishimura, R. y Maeda, Y. (2004). Inactivation effect of sonication and chlorination on *Saccharomyces cerevisiae*. Calorimetric analysis. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3-4), 167-172.

Vázquez, S. M., Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), 64-71.

Valbuena, E., Barreiro, J., Sánchez, E., Castro, G., Kutchinskaya, V. y Briñez, W. (2008). Predicción del crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en leche descremada estéril en función a la temperatura. *Revista Científica FCV-LUZ*, 6, 745-758.

Villamiel, M. y de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478.

Walstra, P. y Jenness, R. (1984). *Dairy chemistry and physics (Primera edición)*. New York: Wiley-Interscience, 98-150.

Walstra, P., Wouters, J. T. M. y Geurts, T. J. (2006). *Dairy Science and Technology (2nd edición)*, Boca Ratón, Florida: CRC, Taylor and Francis Group, 20-26.

Weiss, A., Doming, K. J., Kneifel, W. y Mayer, H. K. (2010). Evaluation of PCR-based typing methods for the identification of probiotic *Enterococcus faecium* strains from animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 158, 187-196.

Wick, C., Nienabert, U., Anggraeni, O., Shellhammer, T. H. y Courtney, P. D. (2004). Texture, proteolysis and viable lactic acid bacteria in comercial Cheddar cheeses treated with high pressure. *Journal of Dairy Research*, 71(1), 107-115.

Witzler, J. J. P., Pinto, R. A., De Valdez, G. F., De Castro, A. D. y Cavallini, D. C. U. (2017). Development of a potential lozenge containing *Enterococcus faecium* CRL 183. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 193-196.

Wu, H., Hulbert, G.J. y Mount, J. R. (2001). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science and Technologies*, 1(3), 211-218.

Yang, F., Gu, N., Chen, D., Xi, X., Zhang, D., Li, Y. y Wu, J. (2008). Experimental study on cell self-sealing during sonoporation. *Journal Controlled Release*, 131(3), 205-210.

Yang, X.Y., Lu, J., Sun, X. y He, Q. Y. (2012). Application of subproteomics in the characterization of Gram-positive bacteria. *Journal of Proteomics*, 75, 2803-2810.

Yeo, S. K. y Liong, M. T. (2013). Effects of ultrasound on bioconversion of isoflavones and probiotic properties of parent organisms and subsequent passages of *Lactobacillus*. *LWT Food Science and Technology Journal*, 51(1), 289-295.

Zheng, L. y Sun, D. (2006). Innovative applications of power ultrasound during food freezing processes: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 17(1), 16-23.

Ziadi, M., Bergot, G., Courtin, P., Chambellon, E., Hamdi, M. y Yvon, M. (2010). Amino acid catabolism by *Lactococcus lactis* during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 20, 25-31.

Zimmermann-Stein, K. y Ruiz-Espinoza (2010). Estructura y funcionalidad de proteínas lácteas: Efecto de modificaciones inducidas por medios físicos, químicos y enzimáticos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 29-34.

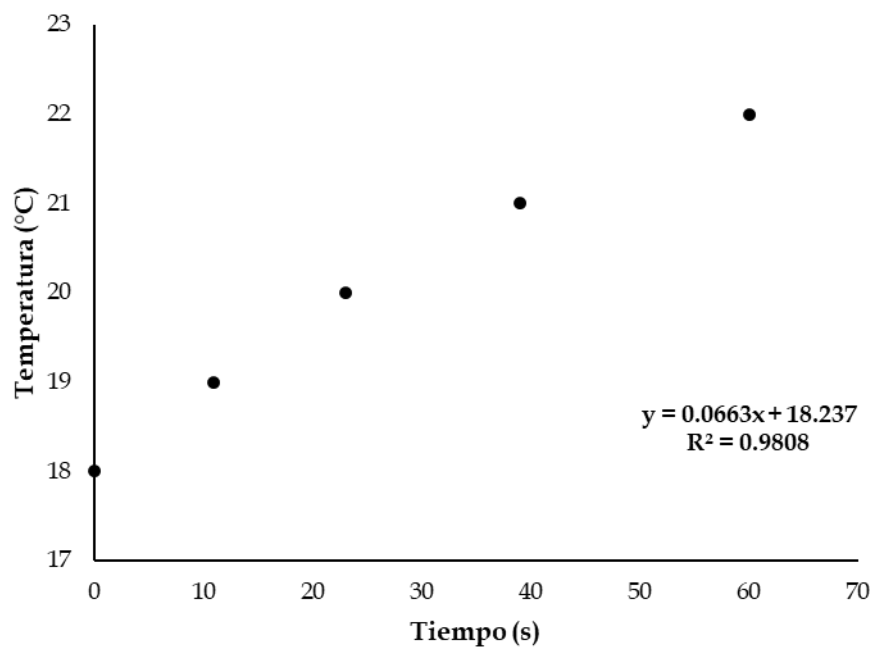
Zuo, J. Y., Knoerzer, K., Mawson, R., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2009). The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16 (4), 462-468.

ANEXO A

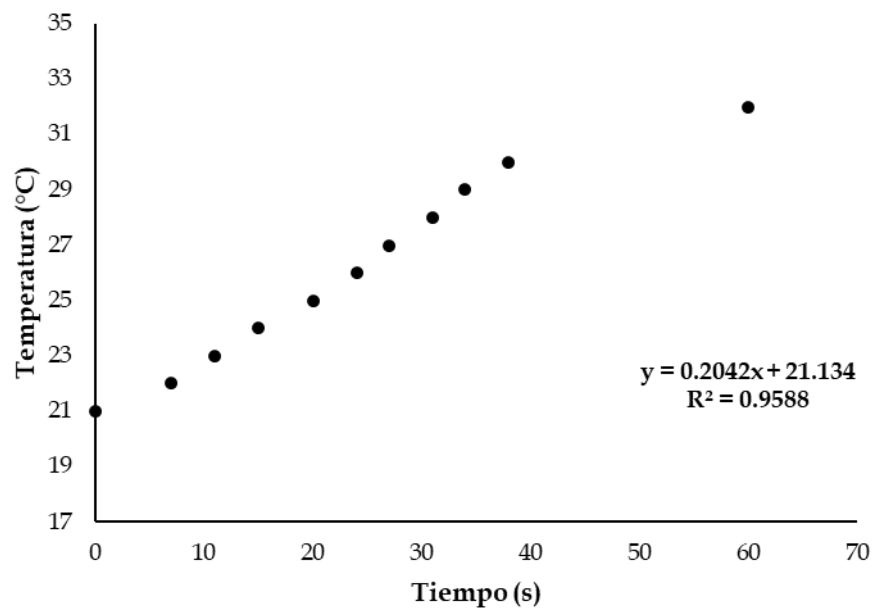
I.

ULTRASONIDO DE SONDA LECHE PARCIALMENTE DESCREMADA

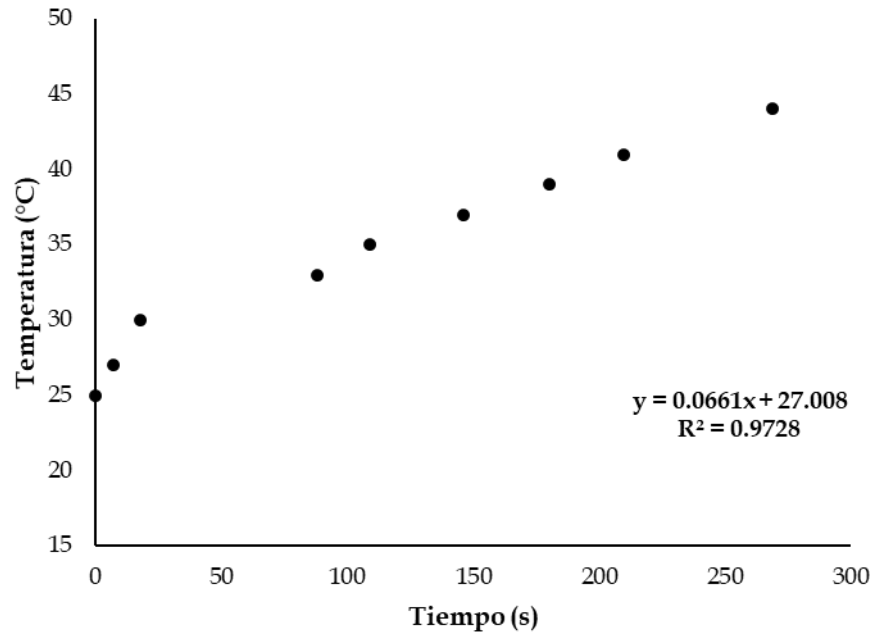
1 min-30 % amplitud



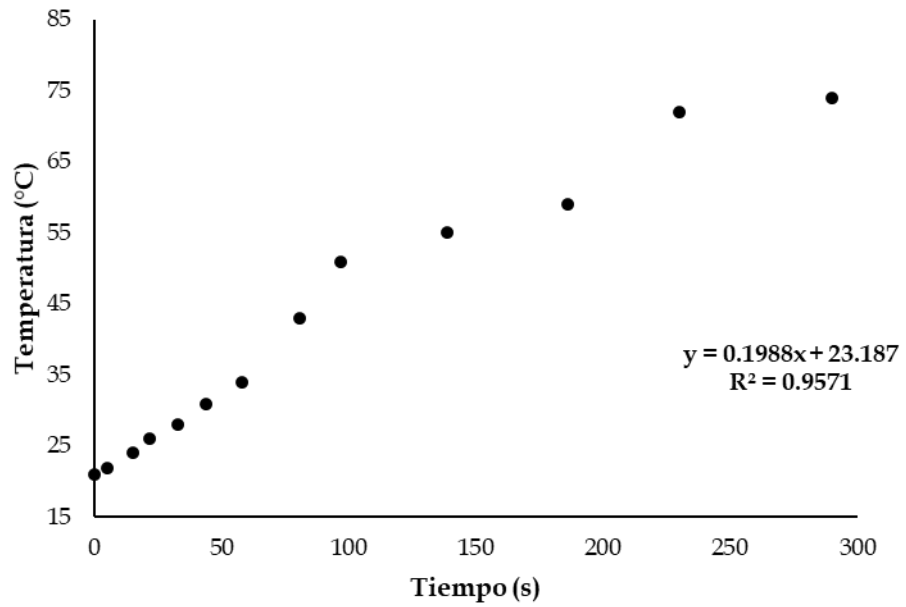
1 min-90 % amplitud



5 min-30 % amplitud



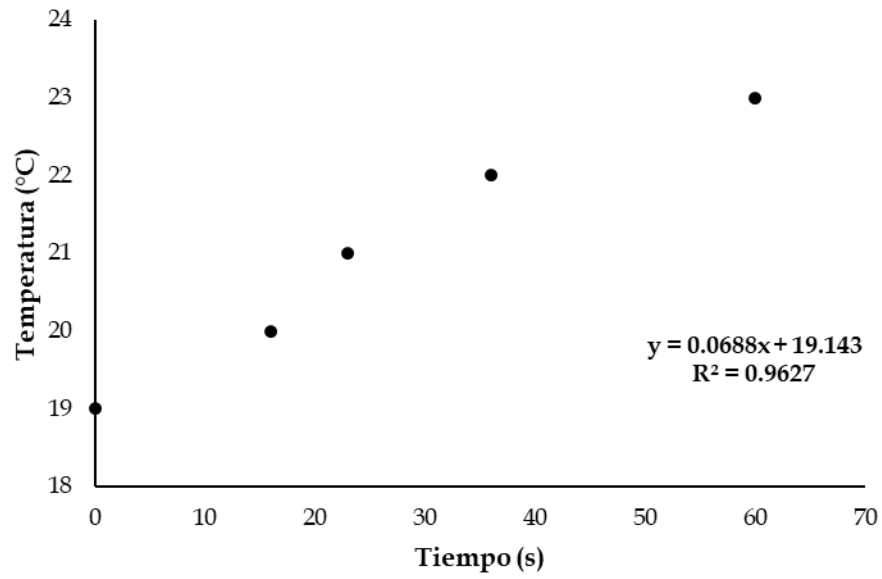
5 min-90 % amplitud



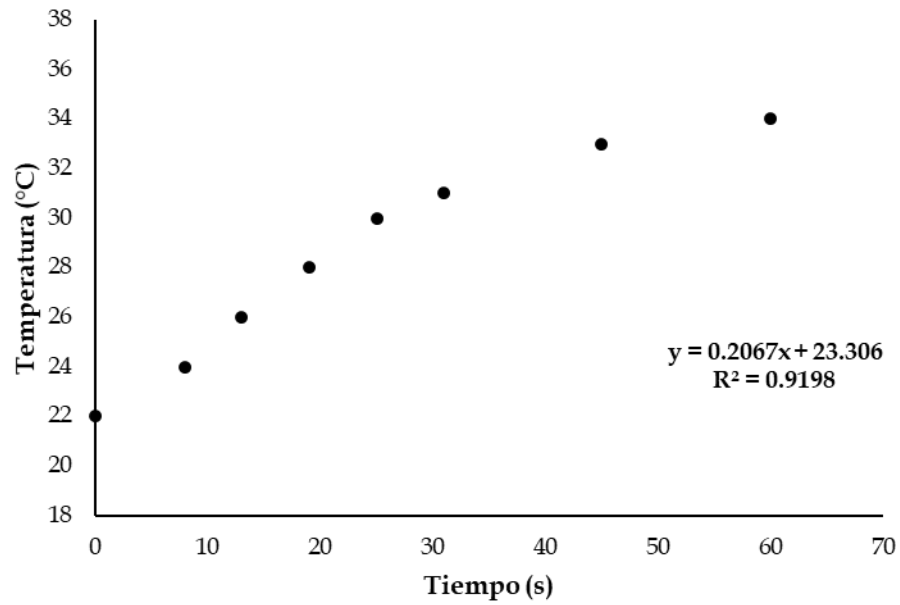
II.

ULTRASONIDO DE SONDA LECHE ENTERA

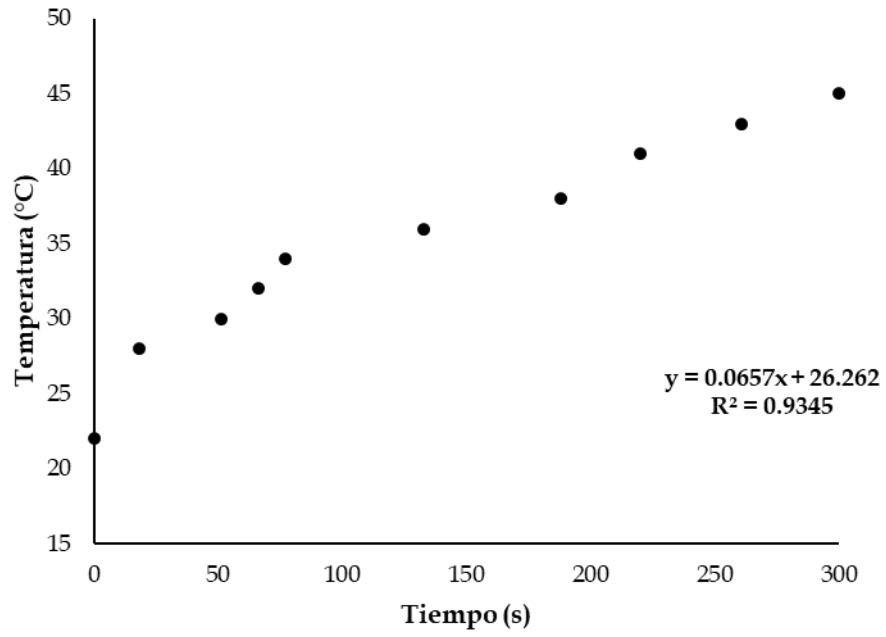
1 min-30 % amplitud



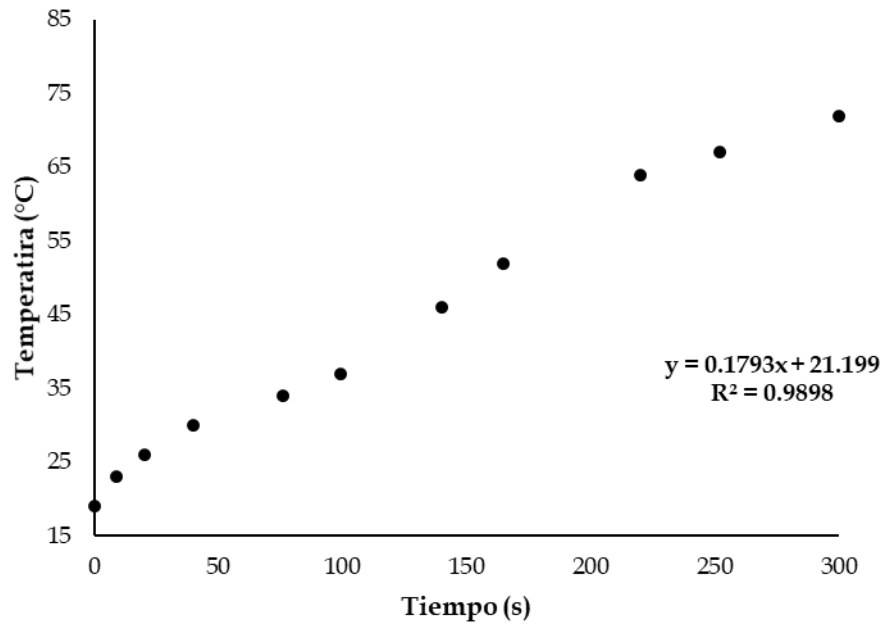
1 min-90 % amplitud



5 min-30 % amplitud



5 min-90 % amplitud

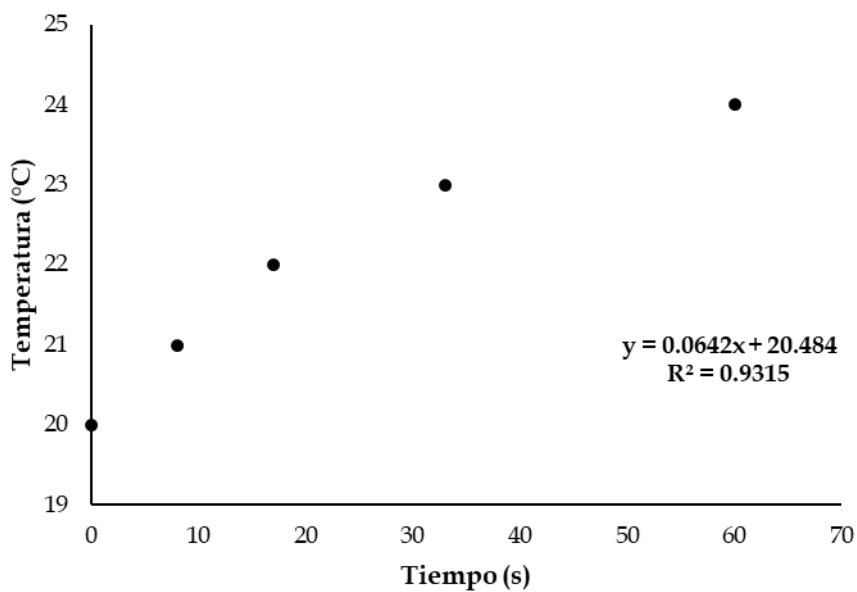


III.

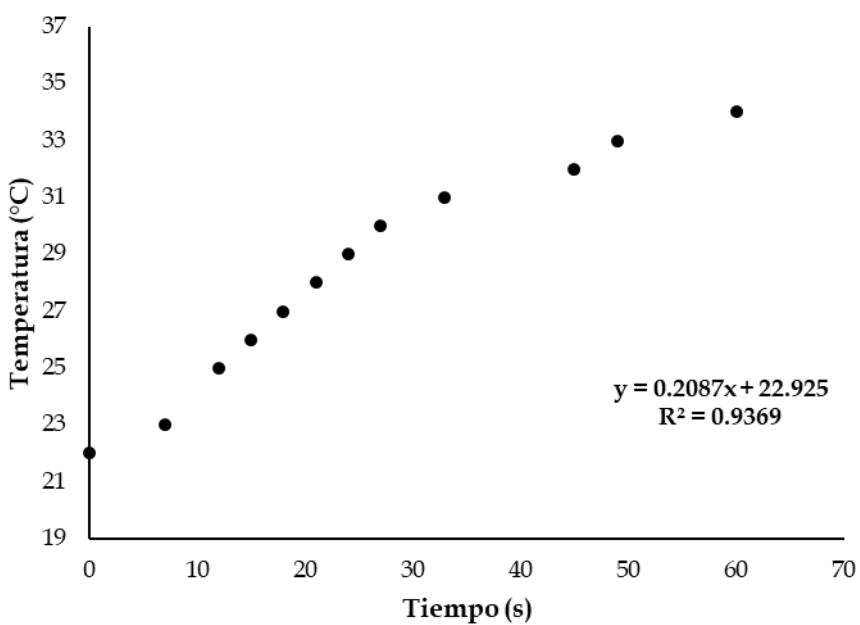
ULTRASONIDO DE SONDA

LECHE DESCREMADA

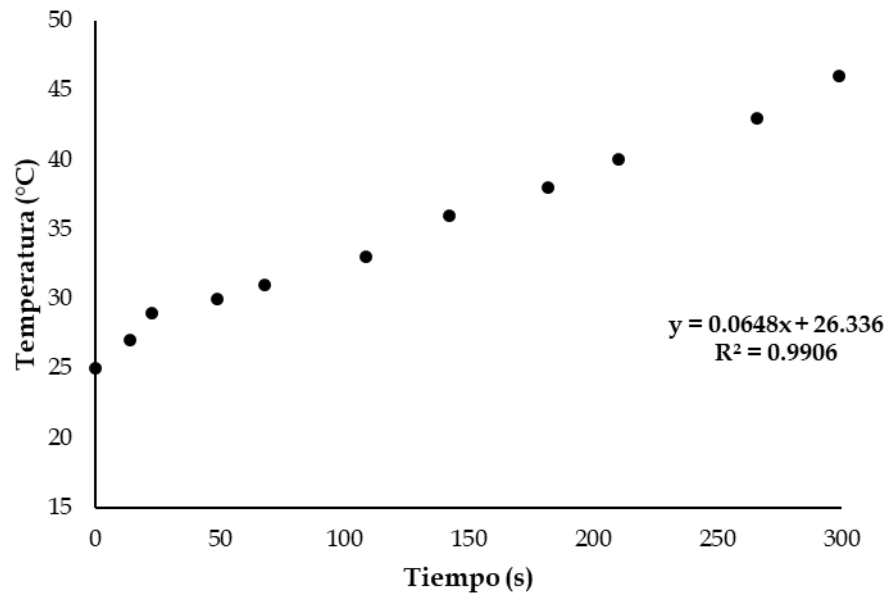
1 min-30 % amplitud



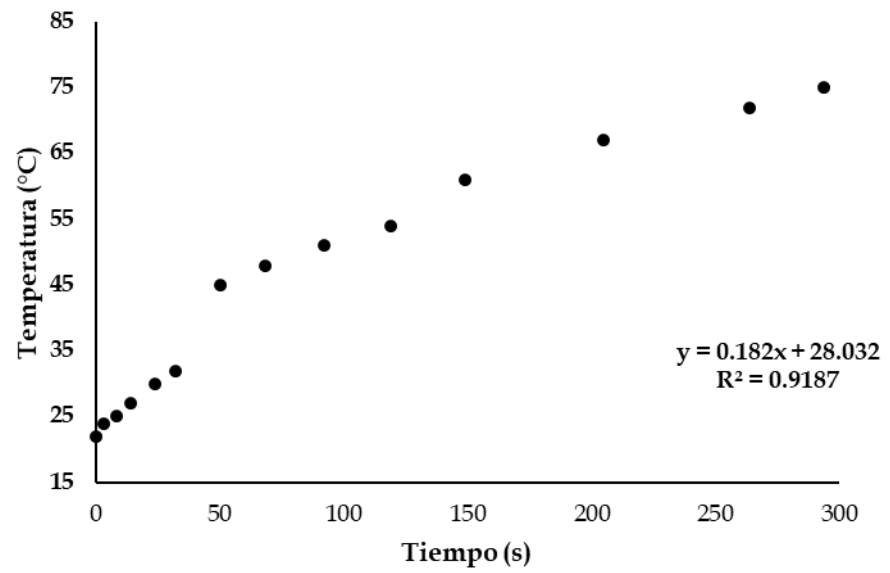
1 min-90 % amplitud



5 min-30 % amplitud



5 min-90 % amplitud



ANEXO B

ULTRASONIDO DE BAÑO AGUA

