

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE
INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO
INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**



**Maestría en Ciencias en Conservación y
Aprovechamiento de Recursos Naturales
(Ingeniería)**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO
DE MICROORGANISMOS LÁCTICOS A TRAVÉS DE
ULTRASONIDOS Y SU TRANSFORMADA WAVELET”**

Tesis

Que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

I. Q. Luis Ricardo Reyes Estévez

Directores de Tesis:

**Dr. Francisco Castellanos León
Dra. Luicita Lagunez Rivera**

Diciembre 2011

Hornos No. 1003, Col. Noche Buena, C.P. 71230
Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 22 del mes de noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Caracterización de la cinética de crecimiento de microorganismos lácticos a través de ultrasonidos y su transformada wavelet"

Reyes

Apellido paterno

Estévez

materno

Luis Ricardo

nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	5	1	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Francisco Castellanos León

Dra. Lucila Lagdnez Rivera

Dr. Prisciliano Felipe de Jesús Cano Barrita

Dr. Andrés Pech Pérez

Dr. Sadoth Sandoval Torres

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Juan Rodríguez Ramírez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 25 del mes noviembre del año 2011, el (la) que suscribe **Reyes Estévez Luis Ricardo** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B091510**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de los Dres. Francisco Castellanos León y Luicita Lagunez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado: **“Caracterización de la cinética de crecimiento de microorganismos lácticos a través de ultrasonidos y su transformada wavelet”** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó luisricardo17@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Reyes Estévez Luis Ricardo



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

RESUMEN

Durante la fermentación láctea, la composición del medio de crecimiento cambia debido al desarrollo, crecimiento y multiplicación de bacterias ácido lácticas que consumen lactosa, aminoácidos, y otros requerimientos nutricionales, produciendo ácido láctico, acetaldehído, exopolisacáridos y otros metabolitos que originan cambios en los parámetros fisicoquímicos del medio tales como pH, viscosidad, acidez, entre otros. Estos cambios afectan la velocidad de propagación de onda y la impedancia acústica de la leche.

Para controlar el proceso fermentativo, cuyo producto final es un alimento, se requieren variables adecuadas desde el punto de vista de manipulación de alimentos, prefiriéndose aquellas que no requieran contacto con el producto y no alteren sus propiedades. Las señales ultrasónicas de baja potencia presentan esta ventaja y han sido aplicadas en el estudio de procesos biológicos.

En la presente tesis se estudiaron las cinéticas de fermentación de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, y la mezcla de ambas a través de la variación del pH, UFC y propagación de ultrasonidos. Las señales ultrasónicas aplicadas se procesaron por medio de la transformada de Fourier y la transformada wavelet. Se concluye que se puede identificar la cinética de fermentación a través de cambios en la atenuación de la onda ultrasónica, sin embargo no es posible identificar las bacterias presentes en una mezcla.

ABSTRACT

During milk fermentation, composition of growth medium changes due to development, growth and multiplication of lactic acid bacteria which consume lactose, amino acids and other nutritional requirements. In return, these bacteria produce lactic acid, acetaldehyde, exopolysaccharides and other metabolites which originate changes in the physicochemical parameters of the medium such as pH, viscosity, acidity, among others. These changes affect the wave propagation velocity and acoustic impedance of the milk.

To control the fermentation process whose end product is a food, appropriate variables are required from the viewpoint of food handling. Monitoring that do not require contact with the product and do not alter its properties is desirable. The low-power ultrasonic signals have this advantage and have been applied in the study of biological processes.

In this thesis, kinetics of fermentation of *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, and the mixture of both are studied through the pH, UFC and ultrasound propagation. Ultrasonic signals applied are processed by means of the Fourier and wavelet transform. It is concluded that identification of the kinetics of fermentation of the bacteria studied through the changes in the ultrasonic wave attenuation is possible, but is not possible to identify bacteria in the mixture case.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por darme la fuerza, habilidad y paciencia para afrontar las diferentes pruebas y retos que han llegado a mi vida.

Al Instituto Politécnico Nacional (IPN) y al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR OAXACA), por el apoyo institucional otorgado durante mi formación académica así como por la beca tesis para concluir mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios.

Al programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN (PIFI), por el apoyo en la realización de este trabajo derivado del proyecto titulado “Caracterización de la fermentación láctica mediante transformada wavelet” con registro 20110131.

Al Dr. Francisco Castellanos León por el valioso conocimiento que aportó durante las asesorías para la realización de la presente investigación, así como en el apoyo de los análisis matemáticos realizados en los datos de esta tesis.

A la Dra. Luicita Lagunez Rivera por las asesorías aportadas, así como por su apoyo en la compra de materiales para la realización de las pruebas biológicas.

A la Dra Ruth Pedroza Islas de la Universidad Iberoamericana y al Dr Juan C. Estrada Mora del CINVESTAV por proveer los microorganismos utilizados en el experimento.

A la Ing. Quím. Carina Gladis Cruz Ramírez, al M. en C. Adrián Enríquez Araujo y a la Quím. Carina Méndez Alberto por su valioso apoyo durante la obtención de los datos y análisis microbiológicos.

A mis amigos Emilio, Cesar y Xóchilt por su amistad y apoyo durante el tiempo que compartimos juntos, principalmente durante los seminarios.

DEDICATORIA

A DIOS por mostrarme el camino.

A mis padres, Juan Rosalio Reyes López y Francisca Catalina Estévez Rojas por todo su sacrificio realizado para mis primeros estudios.

A mi esposa Luz Pilar Méndez Vásquez por el apoyo emocional para realizar mis estudios.

A mis hijos Uriel Rosalio Reyes Méndez y Orlando Emmanuel Reyes Méndez deseándoles que cumplan todos los objetivos que se planteen en sus vidas.

--¿Sabes cuando has alcanzado la felicidad?
--Cuando ya no te interesa esa respuesta”

ÍNDICE

	Pág.
1. ANTECEDENTES	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. OBJETIVOS	4
3.1.OBJETIVO GENERAL	4
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
4. HIPÓTESIS	5
5. MARCO TEÓRICO	6
5.1.PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS	6
5.1.1. DIVERSIDAD DE LAS LECHES FERMENTADAS	7
5.1.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	7
5.1.2.1. <i>Streptococcus thermophilus</i>	8
5.1.2.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	8
5.1.2.3. INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	9
5.1.3. CAMBIOS DURANTE LA FERMENTACIÓN LÁCTEA	10
5.1.3.1. CARBOHIDRATOS	10
5.1.3.2. PROTEÍNAS	11
5.1.3.3. GRASAS	11
5.1.3.4. VITAMINAS	11
5.1.3.5. TEXTURA Y VISCOSIDAD	11
5.1.4. PROCESOS DE CONTROL	12
5.2.ULTRASONIDOS	13
5.2.1. ONDAS ULTRASÓNICAS	14
5.2.2. NOMENCLATURA	17
5.3.PROCESAMIENTO DE SEÑALES	19
5.3.1. ANÁLISIS EN LA FRECUENCIA	20
5.3.2. ANÁLISIS TIEMPO-FRECUENCIA	22
6. METODOLOGÍA	26
6.1.MATERIALES Y EQUIPO	26
6.2.PRUEBA PRELIMINAR	31
6.3.DISEÑO EXPERIMENTAL	32
7. RESULTADOS	37
7.1.PRUEBA PRELIMINAR	37
7.2.EXPERIMENTOS REALIZADOS	41

7.2.1. VARIACIÓN DE TEMPERATURA	42
7.2.2. CURVAS DE pH	42
7.2.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO	43
7.2.4. SEÑALES ULTRASÓNICAS DE LA EXPERIMENTACIÓN	44
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	46
8.1. ANÁLISIS DE LA PRUEBA PRELIMINAR	46
8.2. ANÁLISIS DE LAS SEÑALES OBTENIDAS EN LA EXPERIMENTACIÓN	51
8.2.1. ANÁLISIS EN EL TIEMPO	51
8.2.2. ANÁLISIS EN LA FRECUENCIA	54
8.2.3. ANÁLISIS WAVELET	60
9. CONCLUSIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67

1. ANTECEDENTES

En el estudio del desarrollo de microorganismos, existen trabajos acerca de su crecimiento utilizando diferentes modelos de cinética (Zwietering *et al.*, 1990, 1994) donde se presentan ecuaciones diferenciales de uno o más ordenes y con variables que van desde 2 hasta 15, de esta forma se garantiza que exista una ecuación para una forma de crecimiento y una bacteria en específico, sin embargo se deben ajustar ciertos coeficientes para la bacteria, no profundizan en el análisis de las variables y no son adecuados para realizar el monitoreo o caracterización de un proceso microbiológico. Por lo tanto, hay una necesidad en el desarrollo de nuevas técnicas para la detección e identificación de agentes patógenos simultáneo al monitoreo de un proceso, debido a que los tradicionales toman mucho tiempo y son laboriosos.

Con la necesidad de detectar de forma rápida y eficiente la presencia de microorganismos, se han desarrollado técnicas que utilizan las propiedades bioeléctricas, bioquímicas y físicas de ellos. Dentro de las técnicas físicas se encuentra el peso seco, filtración, conteo de células viables, densitometría, turbidez entre otras (Hobson, 1996), son técnicas relativamente sencillas aunque el principal problema se debe a errores del operador; en el caso del cálculo del peso seco y filtración no se recomienda en muestras donde existan partículas no solubles, que resulta en valores erróneos en la lectura; en el caso del cálculo de turbidez y densidad se presentan problemas al tener que elaborar una curva de crecimiento para cada microorganismo y condición de crecimiento, si las condiciones cambian se tiene que elaborar una nueva curva (Hobson, 1996).

Dentro de las técnicas bioquímicas se encuentran la fluorescencia (Errampalli *et al.*, 1998; Fanatsu *et al.*, 2002), citometría de flujo (Veal *et al.*, 2000; Cram, 2002), espectroscopía (Ellis *et al.*, 2002), el enfoque de la dispersión de luz (Perkins y Squirrell, 2002; Nebeker *et al.*, 2001), electroforesis en gel de gradiente desnaturante (Jae-Hyung *et al.*, 2009) y la detección mediante la tecnología de fibra óptica (Kramer y Lim, 2004).

Aunque estas técnicas han reducido el tiempo necesario para detectar microorganismos en los alimentos, aún presentan problemas como en el análisis de señales luminosas, donde la dispersión de la luz procedente de otras fuentes dentro de la muestra, debido a partículas de fondo, puede dar falsos resultados.

Respecto a las variables más utilizadas para realizar el seguimiento de la cinética de fermentación, la acidez es la variable más ocupada en la fermentación de productos lácteos. Sin embargo, existen otras variables que aportan información sobre el grado de la fermentación desde diferentes aspectos, como el pH (De Brabandere y De Baerdemaeker, 1999), potencial redox (Kwong *et al.*, 1992; Berovic, 1999; Van Dijk *et al.*, 2000; Cheraiti *et al.*, 2005; Kukec *et al.*, 2002), conductividad eléctrica (Paquet *et al.*, 2000), número de unidades formadoras de colonias, viscosidad, concentración de sustrato o producto final, entre otros. Por ejemplo, Wüst y Rudzik (2003) emplearon la espectroscopia infrarroja para monitorear la calidad de la leche, mientras que Yongni *et al.*, (2007) emplearon espectroscopia infrarroja para determinar el contenido de azúcares y la acidez del yogurt.

En cuanto al manejo de señales ultrasónicas, Ogasawara *et al.* (2006) realizaron un análisis en el cambio de fase de una señal ultrasónica senoidal obtenida durante una fermentación, cuyo inóculo fue yogurt Caspian Sea. Llegaron a la conclusión de que la fase de la onda se ve afectada por la fermentación e indican que mediante este método se reduce el riesgo de contaminación de los alimentos, sin embargo no profundizaron en otra información de la señal ni relacionaron la información con la velocidad de propagación del medio.

Mientras Resa *et al.* (2007) realizaron un análisis sobre la variación de la velocidad de propagación de una señal ultrasónica durante el crecimiento de *Lactobacillus casei* en medio MRS. Y llegaron a la conclusión de que la transformación de azúcares en ácido láctico disminuye la velocidad de propagación de la onda.

Ibarra *et al.* (2008) realizaron un estudio en el que aplicó la transformada wavelet a un proceso de fermentación, sus resultados fueron enfocados al análisis del potencial redox durante el desarrollo de una mezcla de microorganismos, concluyendo que es un buen indicador de la actividad metabólica de las bacterias.

2. JUSTIFICACIÓN

Se estudia la fermentación láctea de dos microorganismos bien conocidos, *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*, debido a que presentan diferentes formas celulares y producen diferentes compuestos, lo que afecta a las características del medio de forma diferente.

Se utilizan señales ultrasónicas de baja potencia debido a que este tipo de señales aporta información sobre la densidad y viscosidad del medio a través de la velocidad de propagación de la onda, y cuyo análisis es complementario a otras técnicas que utilizan como variable la acidez o el número de unidades formadoras de colonias, además de no afectar al crecimiento de los microorganismos lácticos estudiados. Con ello se pretende aportar un mayor conocimiento en el análisis del proceso fermentativo.

Debido a que la información asociada a la velocidad de propagación está en función del tiempo y no solo de la frecuencia, se considera adecuado un análisis en el dominio del tiempo y de la frecuencia simultáneamente, esta ventaja la presenta la transformada wavelet, que resulta más adecuada en comparación a otras técnicas de análisis como la transformada de Fourier.

El análisis tiene la finalidad de implementar métodos complementarios para seguir la evolución y concentración de cultivos lácticos en un medio específico, en este caso en yogurt.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las cinéticas de crecimiento de los microorganismos lácticos *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* a partir del análisis de señales ultrasónicas mediante la transformada wavelet continua.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar variables y parámetros para realizar el estudio de la cinética de crecimiento de los microorganismos relacionados a las condiciones del medio, además de la excitación y el registro de las señales ultrasónicas.
- Monitorear la cinética de crecimiento de diferentes bacterias lácticas mediante el empleo de señales ultrasónicas, análisis fisicoquímico y microbiológico.
- Identificar patrones de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* en distribuciones de tiempo-frecuencia obtenidas mediante la transformada wavelet continua de las señales ultrasónicas correspondientes.
- Validación de los patrones de crecimiento obtenidos mediante la transformada wavelet continua al compararlos con los resultados correspondientes al análisis fisicoquímico y microbiológico
- Demostrar que existen dichos patrones individuales en un medio microbiológico con la mezcla de ambas bacterias.

4. HIPÓTESIS

Los cambios en la propagación de las señales ultrasónicas causados por la variación de la composición durante el proceso fermentativo lácteo, que modifican la densidad y la composición de la leche, permiten caracterizar las cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus* a través de análisis mediante la transformada wavelet continua.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

La fermentación láctea es uno de los métodos más antiguos practicado por la humanidad para la transformación de la leche en productos con vida de anaquel más largo. El origen exacto de las leches fermentadas en la historia de la humanidad no ha sido bien establecido, pero podría ser de hace 15, 000 años cuando el hombre dejó la recolección para convertirse en un productor de alimentos (Pederson, 1979). Este cambio también incluyó la domesticación de animales, y probablemente se produjo en momentos diferentes en distintas partes del mundo. Evidencia arqueológica muestra que algunas civilizaciones tenían métodos avanzados en agricultura y ganadería así como en la producción de leches fermentadas. Hoy en día diversos productos lácteos fermentados se fabrican en muchos países (Campbell-Platt, 1987; Kurmann *et al.*, 1992), aunque pocos son de importancia comercial.

Se considera que los productos lácteos fermentados tienen su origen en el Medio Oriente, donde la producción de leche siempre ha sido estacional, limitándose a unos pocos meses del año. La razón principal de esta escasez se debe a la falta de producción intensiva de animales, debido a la agricultura que está en manos de los pueblos nómadas que se desplazan de un lugar a otro buscando pastura para la alimentación animal. Este tipo de existencia nómada los obliga a permanecer en el desierto durante meses lejos de ciudades donde podrían vender sus productos de origen animal. Otra característica importante es que en Medio Oriente existe un clima subtropical y las temperaturas de verano pueden alcanzar hasta 40°C. Bajo estas condiciones la leche se agria y se coagula en un corto periodo de tiempo, además del riesgo de contaminación causado por microorganismos en el aire, animales, pienso o manos del ordeñador. Ello hace inviable la posibilidad de transporte e incluso la conservación de la leche durante algún periodo de tiempo. Como resultado la mayor parte de la población consumía la leche sólo en raras ocasiones, haciendo necesario un proceso alterno para su consumo y almacenamiento.

Es evidente que en las primeras etapas, la acidificación de la leche no fue un proceso uniforme, debido a que la fermentación era producida por bacterias no ácido lácticas y daba lugar a un producto que era insípido, indeseable y donde el coágulo era irregular, lleno de agujeros de gas y mostrando extrema sinéresis del suero. Las bacterias ácido lácticas, sin embargo, actuaban sobre la leche para producir un producto fermentado agradable para comer y/o beber, este último producto se le conoce generalmente como leche acida.

Como los animales criados por estos pueblos nómadas fueron vacas, cabras, ovejas y camellos, las tribus debieron desarrollar un proceso de fermentación que tendría bajo control la acidificación de las distintas leches. Por ejemplo, usando los mismos recipientes o agregando leche fresca a una fermentación en curso, calentando ligeramente la leche para concentrar la leche obteniendo coágulos más atractivos, sembrando el cultivo láctico en leche tratada térmicamente, seleccionando gradualmente a las bacterias ácido lácticas capaces de tolerar altos niveles de ácido láctico y erradicando los microorganismos patógenos presentes en la leche.

Aunque la evolución del proceso fue estrictamente intuitiva, la producción de leche agria pronto se convirtió en la principal forma de preservación, y apenas a principios de 1900,

se definieron los microorganismos responsables en la preparación de leches fermentadas a gran escala en las fábricas. Fue en 1908 cuando Metchnikoff propuso que el hombre debía consumir leche fermentada con lactobacilos para prolongar la vida, causando interés en el papel de los probióticos sobre la salud humana (Hughes y Hoover, 1991; O'Sullivan *et al.*, 1992; Lourens-Hattingh y Viljoen, 2001).

5.1.1. DIVERSIDAD DE LAS LECHES FERMENTADAS

Alrededor de 400 nombres genéricos son aplicados a los productos lácteos fermentados tradicionales e industrializados fabricados en todo el mundo (Kurmann *et al.*, 1992). Aunque muchos de estos productos tienen diferentes nombres, algunos son prácticamente los mismos. En función al tipo de leche, especies microbianas y sus productos metabólicos principales, Robinson y Tamime (1990) propusieron un esquema de clasificación para las leches fermentadas que los divide en 3 grandes categorías: fermentaciones ácidas, fermentaciones levadura-ácidas y fermentaciones hongo-ácidas.

Debido a que diversas comunidades aplicaron diversos métodos fermentativos para la preservación de la leche, se obtuvieron diversos productos, entre ellos el yogurt (de la palabra turca "jugurt"), donde numerosas variantes de esta palabra ha aparecido en los últimos años. De acuerdo al código de regulación federal de la Food and Drug Administration (FDA, 1996), el yogurt es definido como el alimento producido por fermentación de uno o más de los ingredientes lácteos opcionales (crema, leche, leche parcialmente descremada, leche descremada) con un cultivo microbiológico que contenga *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Mientras que otro de los productos lácteos populares para la entrega de células viables de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* es el bio-yoghurt.

Recientemente se comienza a entender la interrelación entre los microorganismos intestinales y los beneficios de salud que se derivan de ellos, donde se considera que el óptimo equilibrio en la población microbiana en el tracto digestivo es responsable de una buena nutrición y salud (Rybka y Kailasapathy, 1995).

5.1.2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se considera que mantienen el equilibrio de la población microbiana en el tracto digestivo al producir sustancias que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, además de digerir la lactosa que es de difícil asimilación por ciertos grupos humanos. Una cantidad suficiente de células viables de BAL debe ser consumida con regularidad para mantener este efecto en el consumidor.

El primer estudio bacteriológico a una leche fermentada fue hecho en 1905 por Grigoroff (Gavin, 1968) quien observó tres diferentes microorganismos presentes, nombrados como diplostreptococcus, *Lactobacillus* en forma de coco y *Lactobacillus* en forma de bastón. La misma observación fue reportada en 1908 por Lüerssen y Kühn (Gavin, 1968). La popularidad de estos microorganismos se dio cuando Metchnikoff (1910) postuló la teoría de que la ingestión de bacterias ácido lácticas conocidas como *Bulgarian bacillus* prolongaba la vida y la salud, la acción de estos microorganismos suponía que inhibían el crecimiento de microorganismos putrefactivos en el intestino.

Los nombres de estos microorganismos han variado desde esa época, por ejemplo, el *Bulgarian bacillus* cambió su nombre a *Thermobacterium bulgaricum* (Orla-Jensen, 1931), posteriormente se designó como *Lactobacillus bulgaricus* y actualmente se le conoce como *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. De acuerdo a la séptima edición del manual de Bergey (1957) todas las bacterias ácido lácticas fueron agrupadas en una sola familia, Lactobacillaceae, la cual se dividía en Streptococceae y Lactobacillaceae. Esta clasificación se reorganizó en la octava edición del manual de Bergey (1974) dando dos familias separadas, Streptococcaeae y Lactobacillaceae. Mientras que en la última edición del manual de Bergey (1986) los mismos organismos fueron agrupados en diferentes secciones.

En la actualidad se considera que dentro del grupo de las BAL se encuentran los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Bifidobacterium*. La bacteria *S. thermophilus* pertenece al género *Lactococcus* mientras que *L. acidophilus* pertenece al género *Lactobacillus*.

5.1.2.1. *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus (*Streptococcus salivarius* spp *thermophilus*) es una de las bacterias más conocidas del genero *Lactococcus*, y como su nombre lo indica, es una bacteria termófila, con una temperatura óptima de crecimiento de entre 40° C a 45° C, pero puede hacerlo hasta 50° C (Veisseyre, 1986). Se caracteriza por ser grampositiva, de forma ovoide o esférica, de 0.5 a 2.0 micrómetros de diámetro, sin motilidad, y no forma esporas. Son catalasa y ureasa negativa, pero varían en su respuesta de hidrólisis de esculina, arginina hidrolasa y Voges-Proskauer (Iyer *et al.*, 2010).

Estas se clasifican de acuerdo a sus características bioquímicas, metabólicas, serológicas y al tipo de hemólisis que producen en el agar sangre. Como hábitat se reporta la leche y productos lácteos, en alimentos y materiales provenientes de plantas y suelos, se le utiliza como fermento arrancador (también llamado cultivo iniciador o starter) en la industria quesera durante la manufactura de quesos frescos, madurados y también de pasta cocida, a través de siembras directas.

Son homofermentativos, no toleran más de 4% de sal. Se sabe que hidrolizan la lactosa mediante una α -galactosidasa, α -galactosa y glucosa; que posteriormente transforman en ácido láctico L (+) por la vía Embden Meyerhof Parnas. También fermentan fructosa y sacarosa. Finalmente, son también responsables del aroma agradable del producto, por la formación de compuestos carbonilo tales como acetaldehído y diacetilo (Hardy Diagnostics, 2000).

5.1.2.2. *Lactobacillus acidophilus*

Dentro del género *Lactobacillus* se encuentra *L. acidophilus*, posee forma bastonada de 3 a 5 micrómetros de largo, es del tipo grampositivo y su metabolismo es homofermentativo, son aerotolerantes y carecen de citocromos y porfirinas, por esta razón son catalasa negativo y oxidasa negativo, captan oxígeno por medio de las oxidasas de las flavoproteínas, oxidación usada para producir peróxido de hidrógeno, o para oxidar el NADH procedente de la deshidrogenación de los azúcares, fermentan la lactosa a lactato en forma casi exclusiva y se ha reportado que pueden utilizar ampliamente la salicina y

celobiosa, en menor proporción fructosa y glucosa, pero muy poca manosa y sorbitol (Shah, 2000). Diversos estudios indican que *L. acidophilus* tiene efecto hipocolesterolemio y previene diarreas.

5.1.2.3. INTERACCIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La presencia de bacterias de distintos géneros en un mismo medio de cultivo genera interacciones entre ellas, las cuales producen comportamientos distintos a los que se obtendrían por separado.

S. thermophilus y *L. bulgaricus* presentan una relación simbiótica en la elaboración de yogurt y su proporción entre especies cambia constantemente (Radke-Mitchell y Sandine, 1984). Durante la fermentación, *S. thermophilus* crece rápidamente al principio utilizando aminoácidos esenciales producidos por *L. bulgaricus*. Mientras *S. thermophilus* produce ácido láctico, lo que reduce el pH a un nivel óptimo para el crecimiento de *L. bulgaricus*. El ácido láctico producido y pequeñas cantidades de ácido fórmico estimulan el crecimiento de *L. bulgaricus*.

Las bacterias del género *Streptococcus* se inhiben a los valores de pH de 4.2-4.4, mientras que el género *Lactobacillus* toleran valores de pH en el rango de 3.5-3.8. Después de aproximadamente 3 horas de fermentación, los números de los dos microorganismos deben ser iguales. Con más tiempo de fermentación, la tasa de crecimiento de *S. thermophilus* disminuye, mientras *L. bulgaricus* continúa reduciendo el pH con la producción de cantidades excesivas de ácido láctico. El pH de yogurt comercial se encuentra generalmente en el rango de 3.7-4.3 (Hamann y Marth, 1983). Aunque *S. thermophilus* forma acetaldehído como un producto del metabolismo, el camino es menos activo a temperaturas de fermentación normal comparado con *L. bulgaricus* que produce acetaldehído responsable del sabor característico (Davis *et al.*, 1971).

Un medio potencial de crecimiento, tal como bio-yoghurt, contiene productos metabólicos secretados por otros microorganismos, que influyen en la viabilidad de *L. acidophilus* y *B. bifidum* (Gilliland y Speck, 1977). Dave y Shah (1997a) han informado de que la inhibición de bifidobacterias no se debe a los ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, la inhibición de este organismo se presume es debido a los efectos de antagonismo entre las bacterias de arranque. Dave y Shah (1997b) encontraron que la bacteriocina, acidophilicin LA-1, producida por *L. acidophilus* es activo contra siete cepas de *L. bulgaricus*, una cepa de *L. casei*, *L. helveticus* y *L. jugurti*, pero no contra otras BAL.

Un estudio realizado por Gilliland y Speck (1977) muestra que el *L. acidophilus* añadido al yogurt disminuyó en número durante el almacenamiento refrigerado, sustancias producidas por *L. bulgaricus* causaron esta inestabilidad. El peróxido de hidrógeno producido durante la fabricación y almacenamiento de yogurt parece ser la principal sustancia responsable del antagonismo de *L. bulgaricus* hacia *L. acidophilus*, añadiendo catalasa se redujo el antagonismo. Hull *et al.* (1984) se refirieron a la dramática pérdida de la viabilidad de *L. acidophilus* como "la muerte del *acidophilus*". *L. acidophilus* no pudo sobrevivir en el yogurt comercial cuando poblaciones altas de *L. bulgaricus* estaban presentes (Rybka, 1994). En una prueba realizada por Rybka (1994), la presencia de *L. bulgaricus* también fue encontrada como el principal factor negativo responsable de la mortalidad de *L. acidophilus* y *Bifidobacterium*. Cuando *L. bulgaricus* fue excluido de la fermentación, la disminución en el pH se redujo significativamente durante el

almacenamiento. *L. bulgaricus* causa sobreacidificación durante la fabricación y el almacenamiento. Esto se puede prevenir mediante el uso de cultivos iniciadores ABT-yogur (fermentada con *L. acidophilus*, *B. bifidum* y *S. thermophilus*) (Kim *et al.*, 1993).

Las cepas de *L. acidophilus* viven en excelente simbiosis con bifidobacterias suministrando los estimulantes de crecimiento necesarios, debido a su actividad proteolítica (Hansen, 1985). Las dos especies se utilizan en una proporción determinada, por ejemplo 700-800 millones de bacterias acidophilus/ml y 400-500 millones de bifidobacterias /ml en la producción de AB-yogur (Hansen, 1985). La tasa de crecimiento de *L. acidophilus* no se ve afectada por *B. bifidum*, pero el crecimiento de *B. bifidum* se suprime si el inóculo inicial está en proporción menor de $10^4:10^3$ (*B. bifidum*: *L. acidophilus*). Mientras que *S. thermophilus* actúa como un eliminador de oxígeno en el bio-yoghurt facilitando el crecimiento de *Bifidobacterium* spp. (Shankar y Davies, 1976; Ishibashi y Shimamura, 1993).

La razón principal para la correcta selección de los cultivos iniciadores usados en la manufactura de leches fermentadas es para alcanzar las características deseadas del producto, como la cantidad de lactato, compuestos aromáticos y exopolisacáridos (EPS), para proporcionar al consumidor una amplia gama de productos terapéuticos, por lo tanto es muy importante realizar una cuidadosa selección de diferentes cepas de microorganismos.

5.1.3. CAMBIOS DURANTE LA FERMENTACIÓN LÁCTEA

Durante el crecimiento de cualquier cultivo láctico, las células se dividen e incrementan en número hasta alcanzar cierto nivel y entonces comienza la muerte. Este comportamiento tiene el nombre de curva de crecimiento y se pueden distinguir 4 secciones diferentes: fase de adaptación, que comienza inmediatamente después de la inoculación y donde la actividad microbiológica se detiene debido a una adaptación del microorganismo al medio; fase logarítmica, donde las células muestran la máxima actividad de crecimiento mientras las condiciones óptimas estén disponibles; fase estacionaria, donde el número de bacterias permanece constante y comienza la acumulación de metabólicos de desecho (ácido láctico); y la fase de muerte, donde el número de células disminuye debido a la falta de condiciones para su crecimiento.

Durante la fermentación del producto lácteo, las BAL deben cumplir con sus requerimientos de carbohidratos, proteínas, lípidos y vitaminas obteniéndolas ya sea del medio de crecimiento o de su interacción con otros microorganismos presentes en la fermentación.

5.1.3.1. CARBOHIDRATOS

Los microorganismos obtienen sus necesidades energéticas a través de uno o varios de los siguientes sistemas: a través del citocromo, la ruta anaplerótica, el ciclo del ácido tricarbónico o por fermentación. Sin embargo, las BAL no poseen ninguno de los tres primeros sistemas y la energía solo puede ser suministrada por la fermentación de los hidratos de carbono (Lawrence *et al.*, 1976), donde la energía se obtiene a través de la fosforilación a nivel de sustrato con enzimas de adenosina trifosfato de la membrana citoplasmática (Nannen y Hutkins, 1991). *S. thermophilus* y *L. acidophilus* fermentan la

lactosa homofermentativamente, y donde el catabolismo de lactosa resulta principalmente en la producción de ácido láctico con pequeñas cantidades de acetaldehído, acetona, diacetaldehído, etanol, anhídrido carbónico y otros compuestos metabólicos (Escamilla-Hurtado *et al.*, 2000; Kandler, 1983; Law y Kolstad, 1983; Escamilla-Hurtado y Olguin-Lora, 1997). Otras BAL, como cepas de *S. thermophilus*, pueden producir EPS a partir de la glucosa y la galactosa presente en la leche.

5.1.3.2. PROTEÍNAS

En la leche, la mayor fracción de proteínas se encuentra en micelas de caseína, la cual se considera tiene un diámetro de entre 60 a 450 nm con un promedio de 130 nm. Durante la fermentación láctea, *S. thermophilus* causa un alto grado de proteólisis, ello es importante debido a que la hidrólisis enzimática de las proteínas de la leche resulta en la liberación de aminoácidos y péptidos, y estos cambios están relacionados a la formación del gel y afectan la estructura del yogurt, además, la liberación de aminoácidos es importante para el crecimiento de *S. thermophilus*.

5.1.3.3. GRASAS

El contenido de grasa en la leche puede variar dependiendo de la especie animal y el régimen alimenticio, variando desde menos del 1% hasta 10% para ganado vacuno, la lipólisis se puede realizar por BAL como *S. thermophilus* y *L. acidophilus* resultando en la generación de ácidos grasos y glicerol a partir de la degradación de triglicéridos, la velocidad de esta reacción se ve aumentada en leche homogeneizada, debido al cambio en el tamaño de glóbulo graso. A pesar de la hidrólisis de las grasas, esta solo se produce en un grado limitado, aunque suficiente para contribuir al sabor del producto (Formisano *et al.*, 1974).

5.1.3.4. VITAMINAS

Las BAL responsables de la fermentación láctica utilizan algunas de las vitaminas presentes en la leche para satisfacer sus requerimientos de crecimiento. Esto puede reducir algunas propiedades nutricionales del producto, sin embargo en la mezcla de *S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, los niveles de ácido fólico se incrementan durante las primeras 3.5 horas para después decaer rápidamente, indicando que *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* comienza a crecer y consume la vitamina producida por *S. thermophilus* para satisfacer sus necesidades de crecimiento (Kaneko *et al.*, 1987), *L. acidophilus* también consume el ácido fólico presente en la leche (Drewek y Czarnocka-Roczniakowa, 1986). Para bacterias productoras de EPS los niveles de tiamina y biotina disminuyen, mientras que para los no productores de EPS incrementan el contenido de biotina, ácido fólico y riboflavina (Erzinkyan *et al.*, 1987).

5.1.3.5. TEXTURA Y VISCOSIDAD

El cambio en la textura de las leches fermentadas se debe a la formación de gel que es resultado de factores biológicos y físicos de la leche, tales como fortificación, homogeneización, tratamiento térmico y catabolismo de la lactosa. Heertje *et al.* (1985)

realizaron un estudio en el que relacionaron cambios en las micelas de caseína durante la acidificación de la leche, y encontraron que de un pH de 6.6 a 5.9 no hay cambio en las micelas de caseína, su tamaño esta cerca de 0.1 μm y están distribuidas homogéneamente en la leche; de un pH de 5.5 a 5.2 ocurre una desintegración parcial de las micelas y las partículas de caseína se agregan para formar estructuras con espacios vacíos entre ellas; de un pH de 5.2 a 4.8 se da lugar a la contracción de agregados de caseína y estas partículas son mucho más largas que las micelas nativas; para niveles menores a 4.5 de pH, un reacomodo y agregación de partículas de caseína llevan a la formación de una matriz de proteína que consiste en un encadenamiento micelar.

Parnell-clunies *et al.* (1988) concluyeron que la formación acida del gel de la leche es un cambio gradual que consiste en un periodo inicial de latencia de baja viscosidad, un periodo de cambio rápido de viscosidad y una fase de alta viscosidad. Donde la disociación de micelas de caseína se produce a un pH de 5.1 y se cree es influenciado por la conversión de Ca coloidal a Ca^{+2} , a pH de 4.8, estas partículas de caseína se vuelven a asociar para formar agregados que no guardan forma o dimensión específica.

5.1.4. PROCESOS DE CONTROL

El monitoreo y control de los procesos microbiológicos en la elaboración de productos lácteos fermentados, es fundamental para tener un control en la calidad del alimento que garantice la homogeneidad del producto final. Uno de los campos de interés es el estudio del crecimiento microbiano y los factores que influyen en él por la microbiología predictiva.

La mayoría de los estudios descritos en la categoría de modelado se basan en el tiempo de crecimiento de ciertos microorganismos utilizando diferentes tipos de modelos de cinética (Zwietering *et al.*, 1990, 1994). Sin embargo, a partir de modelos de crecimiento es difícil supervisar el proceso en la dinámica del crecimiento microbiológico durante la fermentación.

La técnica de análisis en un proceso de control debe detectar a tiempo cambios críticos en el sistema para poder corregirlos, por ello es necesario disponer de algún método para detectar, identificar y/o caracterizar a los microorganismos simultáneamente al monitoreo de un proceso. La detección rápida de agentes patógenos en alimentos es necesaria debido a que los métodos tradicionales toman mucho tiempo y son laboriosos. Por lo anterior, las investigaciones en el campo de la microbiología, se concentran en el desarrollo de tecnologías que permitan detectar e identificar agentes patógenos en alimentos en un período relativamente corto de tiempo.

Otro problema que se presenta, es la falta de indicadores biológicos adecuados para realizar las mediciones, siendo el seguimiento de la cinética a través de la acidez el indicador más utilizado en la elaboración de productos lácteos fermentados. Existen numerosos indicadores a considerar como el pH (De Brabandere y De Baerdemaeker, 1999), potencial redox (Kwong *et al.*, 1992; Berovic, 1999; Van Dijk, 2000; Cheraiti *et al.*, 2005; Kucek *et al.*, 2002), concentración de sustrato o producto final, conductividad eléctrica (Paquet *et al.*, 2000), espectroscopia infrarroja (Yongni *et al.*, 2007; Wüst y Rudzik 2003), en cuanto a la aplicación de ultrasonidos, éstos han tenido un uso en la industria láctea como bactericida, homogenizador, e inactivador de bacterias y enzimas (Povey y McClements, 1988; McClements, 1995), y al respecto, Villamiel y De Jong (2000) indica que las bacterias gramnegativas son más sensibles a los ultrasonidos de

potencia que las bacterias grampositivas. Por otra parte, Coakley *et al.* (2000) estudiaron la manipulación de células a través de ultrasonidos y encontraron que frecuencias ultrasónicas alrededor de 1 MHz son útiles para manipulación de células, sin provocar cavitación ultrasónica. Otros estudios recientes emplean los ultrasonidos como indicadores del grado de fermentación sin afectar a las bacterias presentes.

Algunos trabajos han estudiado la aplicación de señales ultrasónicas para el monitoreo de cinéticas de crecimiento microbiológico. Ogasawara *et al.* (2006) supervisaron la fermentación láctica mediante un transductor acústico y concluyeron que la diferencia de fase de ondas acústicas propagadas entre dos transductores se debía al cambio de la solución causado por la fermentación láctica, además indican que mediante este método se reduce el riesgo de contaminación de los alimentos. Por otra parte Resa *et al.* (2007) realizaron un análisis sobre la variación de la velocidad de propagación de una señal ultrasónica y llegaron a la conclusión de que la transformación de azúcares en ácido láctico disminuye la velocidad de propagación de la onda.

5.2. ULTRASONIDOS

De acuerdo a su potencia, los ultrasonidos se clasifican en ultrasonidos de potencia y ultrasonidos de señal. Los ultrasonidos de potencia (o de alta intensidad) afectan fuertemente el material estudiado, e incluso afectan todo un proceso o una reacción química (actuando como catalizadores), donde muchos de estos efectos son producidos por un fenómeno conocido como cavitación. Tienen una frecuencia por arriba de 20 MHz (el hertzio, Hz, es una unidad de frecuencia y equivale al número de ciclos por segundo), con intensidades superiores a 10 W/cm^2 . Suelen aplicarse mediante ondas continuas, aunque también puede hacerse mediante pulsos.

Los ultrasonidos de señal (conocidos también como de baja intensidad o baja potencia) tienen una potencia tal que se considera no afectan al medio de transmisión, en lugar de ello los ultrasonidos sufren los cambios, siempre que dicho medio sea sensible a las frecuencias contenidas en el ultrasonido. Estos tienen frecuencias que oscilan entre 100 kHz y 20 MHz, con intensidades inferiores a 1 W/cm^2 . Son utilizados para determinar cualidades de materiales, desde órganos humanos hasta las soldaduras de barco. En estos casos se utilizan los llamados transductores de ultrasonidos, instrumentos que actúan de transmisores y de receptores los cuales reproducen el efecto piezoeléctrico. Una vez emitido un pulso de determinada frecuencia, el receptor obtendrá información sobre la velocidad de propagación y la intensidad al pasar por el material objeto del estudio (AEND, 2006). En lo subsecuente se entenderá por ultrasonido o señales ultrasónicas a las pertenecientes a este grupo.

Las propiedades de los ultrasonidos los hacen muy apreciados en ingeniería civil debido a que son capaces de detectar la más mínima fractura en un material. El valor de esta propiedad se observa cuando se trata de mantener en buen estado las estructuras de un barco, una aeronave, un cohete espacial, o el desarrollo correcto de un feto (ultrasonografía), es decir, en aquellas aplicaciones que precisen una inspección no destructiva del material objeto de estudio.

5.2.1. ONDAS ULTRASÓNICAS

Se considera como onda a aquella perturbación que se propaga a través de un medio transportando energía. Existen muchas clasificaciones, entre las más importantes, se clasifican de acuerdo a la periodicidad (periódica y no periódica), el frente de onda (unidimensional, superficial o esférico), la dirección de propagación (longitudinal o transversal) o la naturaleza del medio de propagación (mecánica, electromagnética y gravitacional). Dentro de estas clasificaciones existen más subclasificaciones de acuerdo a la naturaleza del fenómeno que se desee estudiar, por ejemplo, el espectro electromagnético se puede clasificar de acuerdo a su longitud de onda encontrando regiones conocidas como radiofrecuencia, microondas, infrarrojo, luz visible, ultravioleta, rayos X y rayos gama. Mientras que las ondas sonoras se pueden clasificar en función a la frecuencia encontrando los subsonidos (< 20 Hz), ondas sonoras (20 Hz – 20 kHz) y los ultrasonidos (>20 kHz) (Rumack, 2006). Los ultrasonidos empleados en el presente trabajo son ondas mecánicas, longitudinales, con frecuencia superior a 20 kHz.

Debido a su naturaleza mecánica, necesitan de un medio físico para su propagación, ya sea sólido, líquido o gaseoso. La propiedad del medio en que se observa el fenómeno se expresa como una función tanto de la posición como del tiempo. Matemáticamente se dice que dicha función es una onda si cumple con la ecuación 5.1.

$$\nabla^2 \psi(\vec{r}, t) = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} \psi(\vec{r}, t) \quad \text{Ec.5.1}$$

A esta ecuación se le conoce como ecuación de onda, donde v es la velocidad de propagación de la onda, \vec{r} es un vector de posición y $\psi(\vec{r}, t)$ la propiedad relacionada con la onda. La solución de dicha ecuación provee de valiosa información para describir el comportamiento de la propagación de una onda. El desarrollo de la ecuación para encontrar una fórmula aplicable a un fluido, hace uso de las leyes de Hooke y Newton. Dentro de las leyes de Newton se considera que una fuerza es igual a la masa por su aceleración (2ª ley) y que la suma de fuerzas es igual a cero en un cuerpo que se encuentra en equilibrio estático (3ª ley).

Por su parte, la ley de Hooke establece que una deformación unitaria x que experimenta un material elástico es directamente proporcional al esfuerzo aplicado E , donde a la constante de proporcionalidad se le conoce como modulo de elasticidad. Cuando se considera esfuerzos y deformaciones longitudinales, en sólidos prevalecerá el modulo de Young (Y), mientras en el caso de líquidos prevalecerá el modulo de compresibilidad (β).

El modulo de Young esta definido como una constante que relaciona el esfuerzo E aplicado a un elemento que sufre una deformación longitudinal unitaria U (Ec. 5.2), a mayor esfuerzo se dará una mayor deformación. Por su parte, se considerará como esfuerzo E a la fuerza de tensión o compresión F aplicada sobre una unidad de área A (Ec. 5.3). Una deformación longitudinal unitaria U se define como una variación de longitud ΔL sobre el valor de la longitud original L (Ec. 5.4). Por lo tanto, la ecuación que representa al modulo de Young en términos de fuerzas y deformaciones queda definida en la ecuación 5.5.

$$Y = \frac{E}{U} \quad \text{Ec.5.2}$$

$$E = \frac{F}{A} \quad \text{Ec.5.3}$$

$$U = \frac{\Delta L}{L} \quad \text{Ec.5.4}$$

$$Y = \frac{F \cdot L}{A \cdot \Delta L} \quad \text{Ec.5.5}$$

Por su parte, el modulo de compresibilidad relaciona un cambio de presión ΔP con cambios de volumen ΔV (Ec.5.6), el signo negativo indica que un aumento en la presión causa una disminución en el volumen. Cuando se aplica la igualdad volumen igual a masa por densidad, considerando la masa constante, se llega a la ecuación 5.7, el signo positivo indica que a un aumento de presión ocurre un aumento de densidad.

$$\beta = -V_0 \frac{P - P_0}{V - V_0} \quad \text{Ec.5.6}$$

$$\beta = \rho_0 \frac{P - P_0}{\rho - \rho_0} \quad \text{Ec.5.7}$$

Para describir la ecuación asociada al transporte de onda se propondrá un sistema inicial con moléculas estables, donde la forma del sistema es una columna de área transversal A constante, densidad inicial en el reposo ρ_0 y los únicos esfuerzos serán considerados como longitudinales (presión) (Fig. 5.1). Ahora consideraremos un elemento en la posición x , de longitud dx , volumen $A dx$ y masa dm igual a $\rho_0 A dx$ (Ec.5.8).

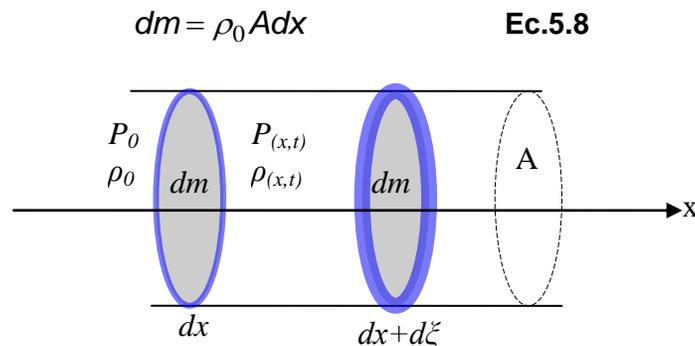


Fig.5.1 Representación del sistema a través de un elemento de masa dm .

Cuando actúe un esfuerzo longitudinal provocará una perturbación debido a una diferencia de presión ΔP que a su vez genera una variación en la densidad $\Delta \rho$ en una parte de la columna. El elemento presentará un desplazamiento longitudinal respecto a su posición de equilibrio y además una pequeña variación $d\xi$ en la longitud del elemento, sin embargo la masa seguirá siendo la misma.

$$dm = \rho A(dx + d\xi) \quad \text{Ec.5.9}$$

Al igualar el valor de las masas (Ec.5.8 y Ec.5.9) y considerando que los cambios en las deformaciones ξ son muy pequeñas, entonces se tiene una ecuación que describe el comportamiento de las deformaciones en función de los cambios de densidad (Ec.5.10).

$$\rho_0 A dx = \rho A(dx + d\xi) \quad \therefore \quad -\frac{\partial \xi}{\partial x} = \frac{\rho - \rho_0}{\rho} \approx \frac{\rho - \rho_0}{\rho_0} \quad \text{Ec.5.10}$$

Adicionalmente, de la ecuación 5.7 se define el modulo de compresibilidad en términos del cambio de densidades (ρ y ρ_0), para generar la ecuación 5.11.

$$P - P_0 = \beta \frac{\rho - \rho_0}{\rho_0} \quad \text{Ec.5.11}$$

Volviendo al sistema y aplicando las leyes de Newton, se observan 2 fuerzas aplicadas (P y P') en los lados laterales del elemento, lo que permite establecer la ecuación 5.12.

$$PA - P' A = ma \quad \text{Ec.5.12}$$

Sustituyendo el valor de la masa en términos de la densidad y el área, y considerando que la diferencia de presiones es pequeña y está asociada a la posición, entonces la ecuación 5.12, queda establecida en la ecuación 5.13.

$$-\frac{\partial P}{\partial x} A dx = (\rho_0 A dx) a \quad \text{Ec.5.13}$$

Donde la aceleración a se considera para las deformaciones ξ en función de la posición x y del tiempo t (Ec.5.14).

$$a = \frac{\partial^2 \xi(x,t)}{\partial t^2} \quad \text{Ec.5.14}$$

Sustituyendo las ecuaciones 5.14 en 5.13, se reescribe la ecuación de movimiento obteniendo una ecuación (Ec.5.15) que relaciona los cambios de presión con las deformaciones

$$-\frac{\partial P}{\partial x} A dx = \rho_0 A dx \frac{\partial^2 \xi(x,t)}{\partial t^2} \quad \Rightarrow \quad -\frac{\partial P}{\partial x} = \rho_0 \frac{\partial^2 \xi(x,t)}{\partial t^2} \quad \text{Ec.5.15}$$

A partir se sustituir la ecuación 5.10 en la 5.11 se obtiene la ecuación 5.16

$$P(\rho) - P_0 = -\beta \frac{\partial \xi}{\partial x} \quad \text{Ec.5.16}$$

Que sustituyéndola en la ecuación 5.15 se obtiene la ecuación de onda para las deformaciones.

$$\frac{\beta}{\rho_0} \frac{\partial^2 \xi(x,t)}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 \xi(x,t)}{\partial t^2} \quad \text{Ec.5.17}$$

Derivando con respecto a x la ecuación 5.15 se obtiene la ecuación 5.18

$$-\frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} = \rho_0 \frac{\partial^2}{\partial t^2} \left(\frac{\partial \xi(x,t)}{\partial x} \right) \quad \text{Ec.5.18}$$

En donde aplicando la ecuación 5.16 se obtiene la ecuación de onda para la presión (Ec.5.19)

$$\frac{\beta}{\rho_0} \frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial t^2} \quad \text{Ec.5.19}$$

Para obtener la ecuación de onda de densidad (Ec.5.20) se sustituye la ecuación 5.11 en la ecuación 5.19

$$\frac{\beta}{\rho_0} \frac{\partial^2 \rho(x,t)}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 \rho(x,t)}{\partial t^2} \quad \text{Ec.5.20}$$

En todas las ecuaciones de onda se verifica que la velocidad de propagación en un líquido esta dado por la ecuación 5.21, en el caso de sólidos el modulo de compresión es sustituido por el modulo de Young. La expresión indica que la velocidad de propagación es mayor si tiene un modulo grande y una densidad pequeña, en el caso de solidos como el aluminio, la densidad es de 2698 kg/m³, el modulo de Young es 7×10¹⁰ Pa y su velocidad de propagación es de 5093 m/s. Para el caso de un líquido como el agua, su densidad es de 1000 Kg/m³, el modulo de compresión es de 2.2×10⁹ Pa y su velocidad de propagación es de 1483 m/s.

$$v = \sqrt{\frac{\beta}{\rho_0}} \quad \text{Ec.5.21}$$

5.2.2. NOMENCLATURA

Los términos empleados son la frecuencia angular ω (rad/s), el número de onda k (ciclos/m), la densidad del material ρ_0 (Kg/m³), la velocidad de onda v (m/s), la presión inicial P_0 (N/m²), la deformación inicial ξ_0 (m) y la perturbación inicial medida en la presión $\rho_0 v \omega \xi_0$ (N/m²) que depende de la frecuencia. Al ser movimientos armónicos se les puede calcular también un periodo T (s), frecuencia f (Hz), longitud de onda λ (m), entre otros (López, 2010), y sufren fenómenos de reflexión, refracción y difusión de forma análoga a las ondas luminosas (Bermúdez *et al.*, 1992; AEND, 2006). Las relaciones entre las distintas características están dadas por ecuaciones bien conocidas, por ejemplo, en un medio cuya velocidad de propagación es constante, el periodo es inversamente

proporcional a la frecuencia, la frecuencia angular es directamente proporcional a la frecuencia (Ec.5.22) y el número de onda es inversamente proporcional a la longitud de onda (Ec.5.23).

$$\omega = 2\pi \cdot f = \frac{2\pi}{T} \quad \text{Ec. 5.22}$$

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} = \frac{\omega}{v} \quad \text{Ec. 5.23}$$

Debido a que el periodo es el tiempo que tarda la onda en cumplir un ciclo, mientras que la longitud de onda es la distancia que recorre durante ese ciclo, dos ondas pueden tener el mismo periodo pero diferentes longitudes de onda, esto se debe a que las ondas se propagan en materiales con diferentes velocidades de propagación. Considerando la frecuencia constante, cambios en la velocidad de propagación afectaran la longitud de onda, pero no al periodo. Por lo tanto, a mayor velocidad de propagación, mayor longitud de onda, mientras que a mayor frecuencia menor longitud de onda (Ec.5.24).

$$\lambda = vT = \frac{v}{f} \quad \text{Ec. 5.24}$$

Otra forma de calcular la velocidad de propagación conociendo la distancia a la que se propaga una onda y el tiempo que tarda en llegar, es mediante la formula más conocida de la rama de la física: la velocidad v es igual a distancia d sobre tiempo t (Ec. 5.25), esto solo es valido si se considera el medio homogéneo. Para ultrasonidos que atraviesan distintas estructuras, existe una velocidad de propagación para cada estructura y depende de las características del medio y se modifica al variar la densidad, la rigidez y la elasticidad del medio de transmisión.

$$v = \frac{d}{t} \quad \text{Ec. 5.25}$$

Con la velocidad de propagación y la densidad de un medio, se puede calcular la impedancia acústica z (Kg/m²s) del medio de propagación (Ec.5.26), definida como el producto de la velocidad de propagación por la densidad del medio (Bermúdez *et al.*, 1992; AEND, 2006). Aunque también suele definirse como la resistencia que se opone a la vibración de los elementos de masa, pero no a la propagación de la onda (AEND, 2006). Cuando un haz de ultrasonidos llega a la superficie de separación de dos medios cuyas impedancias acústicas son diferentes, una parte es refractada, otra se difunde y una última se refleja. Esta propiedad es ocupada para determinar fracturas en materiales, debido a que la onda ultrasónica se refleja cuando se encuentra con la más tenue fisura de aire (Bermúdez, 1992).

$$z = v\rho \quad \text{Ec. 5.26}$$

La intensidad I se considera como la energía que atraviesa por segundo a la unidad de superficie normal a la dirección de propagación, siendo la intensidad directamente proporcional a la amplitud de la onda e inversamente proporcional a la impedancia acústica (Ec.5.27). En el sistema SI, la unidad de medida de la intensidad corresponde al

W/m^2 o $J/s \cdot m^2$, sin embargo basándose en la ley de Weber, válida para efectuar la medida de cualquier tipo de sensación, no solo sonora, se definió otra unidad de medida de intensidad, el decibelio (López, 2010). En general, la transmisión de energía es un proceso que se acompaña de una reducción progresiva de la intensidad, conocido como atenuación. A medida que un haz de ultrasonido atraviesa un medio, se produce una atenuación del mismo a medida que la onda se hace más profunda, esta energía se disipa en forma de calor (Duque y Rubio, 2006). La atenuación depende del tipo de medio, de la profundidad de penetración y de la frecuencia del ultrasonido. Haces de gran frecuencia presentarán una mayor atenuación que aquellos de frecuencia menor (Ruiz, 2010).

$$I = \frac{A}{z} \quad \text{Ec. 5.27}$$

La velocidad de propagación y la pérdida de intensidad son parámetros que se pueden relacionar con determinadas propiedades del medio en que ha atravesado la onda ultrasónica, y que al encontrarse con alguna discontinuidad son reflejados, disminuidos o cambiados, el eco resultante es una señal susceptible de ser obtenida y estudiada para detectar la causa. En condiciones normales, los fenómenos de reflexión, refracción, difusión y atenuación no aparecen de forma aislada, superponiéndose unos a otros (Ruiz, 2010) afectando la señal obtenida. Para facilitar el análisis, se considera que dichos fenómenos son lineales.

5.3. PROCESAMIENTO DE SEÑALES

Una función es lineal si cumple con las propiedades de aditividad y escalamiento (Ec. 5.28), es decir, el efecto total de una suma de causas es igual a la suma de los efectos de cada causa por separado.

$$\begin{aligned} \text{Si} \quad & f_{(a)} = A \quad \text{y} \quad f_{(b)} = B \\ \text{y cumple} \quad & f_{(a)} + f_{(b)} = B + A \\ & k_1 f_{(a)} = k_1 A \quad \text{y} \quad k_2 f_{(b)} = k_2 B \\ \text{entonces} \quad & k_1 f_{(a)} + k_2 f_{(b)} = k_1 A + k_2 B \quad \text{Ec. 5.28} \end{aligned}$$

Debido al concepto de linealidad, una señal es una función que se puede representar como la suma de funciones más simples por ejemplo, polinomios, logaritmos o funciones trigonométricas. Cuando el conjunto en el que se representa la señal son linealmente independientes y generan todo el espacio de funciones, se dice que se forma una base.

Un conjunto de funciones es linealmente dependiente cuando alguno o varios de los elementos pueden ser representados como la combinación de uno o más elementos del conjunto, en caso contrario es linealmente independiente. En muchos análisis, además de que el conjunto sea linealmente independiente, se prefiere utilizar bases cuyo producto punto entre las funciones simples que las componen sea cero.

El producto punto se define para funciones en la ecuación 5.29. Si el producto punto entre dos funciones en un intervalo de tiempo es cero, se dice que dichas funciones son

ortogonales en ese intervalo. La ortogonalidad es deseable para evitar que la información contenida en un elemento de la base se vea afectada por la información contenida en otro elemento de la misma base.

$$\int_{t_1}^{t_2} a(t) \cdot b(t) dt \quad \text{Ec.5.29}$$

Otra aplicación del producto punto es para el cálculo del coeficiente de correlación C_n , considerado como el índice de similitud entre dos funciones definidas en un intervalo de tiempo (Ec.5.30). Si el valor de C_n es igual a 1 se considera una correlación directa, si C_n es igual a -1 se considera inversa, y si C_n es igual a 0, no existe correlación alguna.

$$C_n = \frac{\int_{t_1}^{t_2} a(t) \cdot b(t) dt}{\left(\int_{t_1}^{t_2} [a(t)]^2 dt \right)^{1/2} \left(\int_{t_1}^{t_2} [b(t)]^2 dt \right)^{1/2}} \quad \text{Ec. 5.30}$$

Si lo que se desea es representar una función $a(t)$ en términos de una función $b(t)$, el producto punto permite obtener una constante k que debe ser multiplicada a $b(t)$ para obtener la mejor aproximación a la función $a(t)$ en términos de $b(t)$. A la función obtenida ($k \cdot b(t)$) se le conoce como la proyección de $a(t)$ sobre $b(t)$, donde la ecuación 5.31 se utiliza para conocer la proyección entre funciones.

$$k \cdot b(t) = \frac{\int_{t_1}^{t_2} a(t) \cdot b(t) dt}{\int_{t_1}^{t_2} [b(t)]^2 dt} \cdot b(t) \quad \text{Ec. 5.31}$$

Para facilitar el procesamiento de una señal, ésta debe ser obtenida de forma digital, lo que implica un tiempo de muestreo Δt y un número finito de datos N . Ello sirve en el análisis en el dominio de la frecuencia, debido a que el tiempo total de la señal ($N\Delta t$) está relacionado a la frecuencia mínima, mientras que dos veces el tiempo de muestreo ($2\Delta t$) se relaciona a la frecuencia máxima. Valores altos de frecuencia se asocian a valores pequeños de longitud de onda en un medio homogéneo, lo que permite detectar estructuras pequeñas.

5.3.1. ANÁLISIS EN LA FRECUENCIA

Los conceptos de proyección, ortogonalidad y linealidad se ocupan en el análisis armónico de señales, donde hace 182 años el matemático francés Jean Baptiste-Joseph Fourier publicó el tratado Teoría Analítica del Calor, donde desarrolló el análisis conocido como Series de Fourier del que derivan las bases del análisis armónico de señales.

Lo que Fourier concluyó es que las señales que representan fenómenos complejos periódicos resultan de la combinación lineal de funciones periódicas más simples (senos y

cosenos), el rango de frecuencias utilizado es obtenido a partir de los múltiplos enteros de una frecuencia fundamental n (Ec. 5.33) determinada por el periodo L de la función que se desea analizar, obteniéndose ortogonalidad.

$$f(t) = a_0 + \sum_{n=1}^{\infty} \left[a_n \cos\left(\frac{n\pi t}{L}\right) + b_n \text{sen}\left(\frac{n\pi t}{L}\right) \right] \quad \text{Ec. 5.33}$$

Cada una de las frecuencias obtenidas es afectada por un coeficiente que modifica su amplitud en función de su frecuencia (Ec. 5.34). Desde el punto de vista de algebra lineal, se entiende que la serie de Fourier es la descomposición (o proyección múltiple) de una señal periódica en una base formada por funciones senos y cosenos cuya frecuencia es un múltiplo entero de n .

$$a_0 = \frac{1}{L} \int_{L/2}^{L/2} f(t) dt$$

$$a_n = \frac{2}{L} \int_{L/2}^{L/2} f(t) \cos\left(\frac{n\pi t}{L}\right) dt \quad \text{Ec. 5.34}$$

$$b_n = \frac{2}{L} \int_{L/2}^{L/2} f(t) \text{sen}\left(\frac{n\pi t}{L}\right) dt$$

Si el fenómeno que se pretende estudiar es periódico, esta representación es muy eficiente y adecuada, sin embargo, gran parte de las señales a considerar en una aplicación no presenta esta propiedad de periodicidad, por lo tanto el uso de la Serie de Fourier se vuelve inapropiado e ineficiente. Una forma de solucionarlo propone repetir la señal una y otra vez, donde el periodo de la señal se define como el tiempo de duración de la señal. A pesar de ello la representación alcanzada no es la señal deseada debido a que la señal es finita, para solucionarlo se considera que la señal tiene un periodo infinito, lo que dará como resultado la transformada de Fourier (Ec. 5.34).

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot e^{i\omega t} \cdot dt \quad \text{Ec. 5.34}$$

Donde $F(\omega)$ es una función el dominio de la frecuencia y $f(t)$ es la función en el dominio del tiempo. La exponencial imaginaria es una función compleja formada por la suma de una función coseno (parte real) y una función seno (parte imaginaria) (Ec.5.35) . Recordando la definición de proyección, la transformada de Fourier proyecta la función $f(t)$ a ejes (senos y cosenos) linealmente independientes en términos de la frecuencia.

$$e^{i\omega t} = \cos \omega t + i \sin \omega t \quad \text{Ec.5.35}$$

La idea de descomponer funciones en otras más simples ha sido muy fructífera en matemáticas y la transformada de Fourier ha sido empleada con éxito en las más diversas áreas, debido a ello, en los últimos 20 años ha habido un gran aumento en el número de

técnicas de procesamiento de señales así como un aumento en el rendimiento del equipo y de la memoria que están disponibles para ser implementados en las computadoras a bajo costo y alta velocidad. Tales métodos han sido capaces de extraer información importante de las señales en un rango de áreas de investigación como la medicina (Lin y Chen, 1996) y el procesamiento del habla (Owens, 1993).

Sin embargo es muy común que la información relevante en una señal tenga que ver tanto en los cambios repentinos o discontinuidades de una señal en el tiempo como en su comportamiento periódico, por ello aun persiste cierta desventaja en la transformada de Fourier, debido a que sólo describe la información en términos de frecuencia y no del tiempo, esto significa que aún cuando se pueda determinar todas las frecuencias contenidas en una señal, no se puede saber cuando está presente un valor crítico. Para superar este problema se han propuesto varias soluciones que representan una señal en el dominio del tiempo y de la frecuencia al mismo tiempo.

5.3.2. ANÁLISIS TIEMPO-FRECUENCIA

Entre las soluciones propuestas, se desarrolló la transformada por ventanas de Fourier, la cual consiste en el análisis de la información en distintas secciones de tiempo, es decir, las bases a las cuales se proyecta la señal son ondas senoidales truncadas por una función ventana trasladada un tiempo τ $\Phi(t-\tau)$ (Ec.5.36).

$$F(\omega, \tau) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) \cdot \phi(t - \tau) \cdot e^{i\omega t} \cdot dt \quad \text{Ec. 5.36}$$

Dicha función ventana fue inicialmente definida como una función caja, sin embargo esta función no se consideró adecuada debido a que su transformada en la frecuencia dispersaba la información de la función, para solucionarlo Gabor utilizó como función ventana a una función exponencial (e^{-t^2}) la cual mantiene concentrada la información en la misma forma que su transformada en la frecuencia (Fig 5.2).

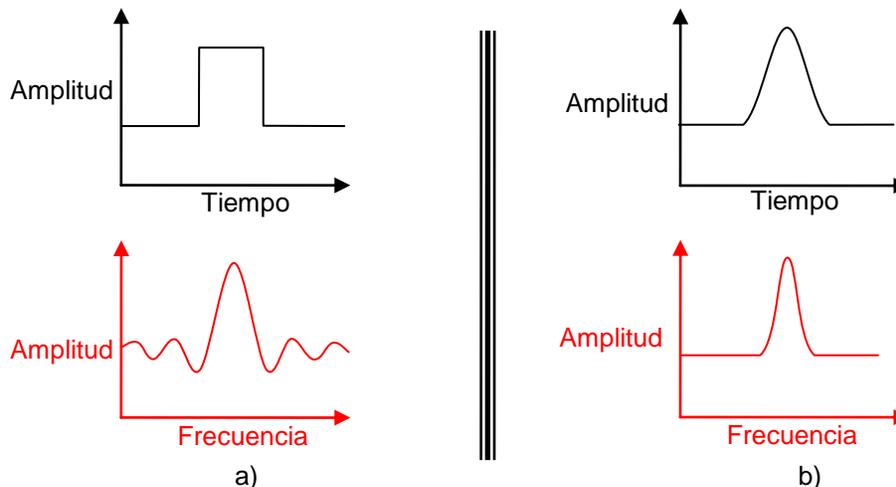


Fig.5.2. Función ventana en el tiempo (negro) y su transformada en la Frecuencia (rojo): a) función caja y b) función exponencial

Al utilizar la transformada por ventanas, el ancho de ventana se considera constante para todas las frecuencias formando una especie de malla (unirresolución o resolución fija). Debido a ello se presenta un inconveniente, con un ancho de ventana grande en el tiempo se obtiene una buena resolución en frecuencia pero se pierde resolución en el tiempo, por su parte, un ancho de ventana pequeño da una buena resolución en el tiempo pero una baja resolución en la frecuencia (Fig.5.3).

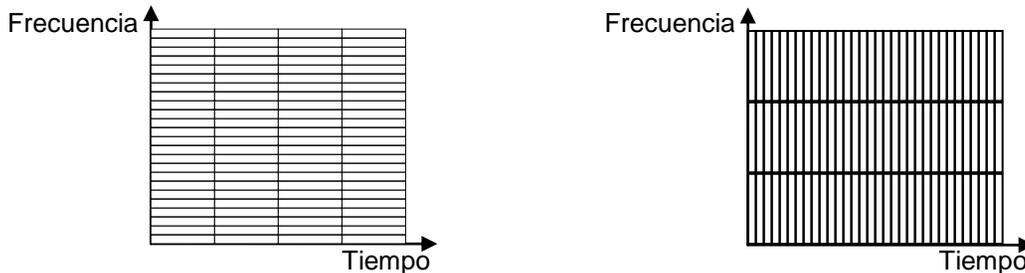


Fig.5.3. Vista de dos análisis uniresolución con diferentes anchos de ventana.

Para resolver el problema de la resolución, en la década de 1980 se introdujo la transformada wavelet, descrita en la ecuación 5.37, esta representa la descomposición de la función $f(t)$ en un conjunto de funciones wavelet $\Psi_{s,\tau}(t)$, que forman una base. Las funciones wavelet tienen una gran variedad de formas (Fig.5.4) a diferencia de la transformada de Fourier, donde la base está formada únicamente de senos y cosenos.

$$W_f(s, \tau) = \int f(t) \Psi_{s,\tau}^*(t) dt \quad \text{Ec. 5.37}$$

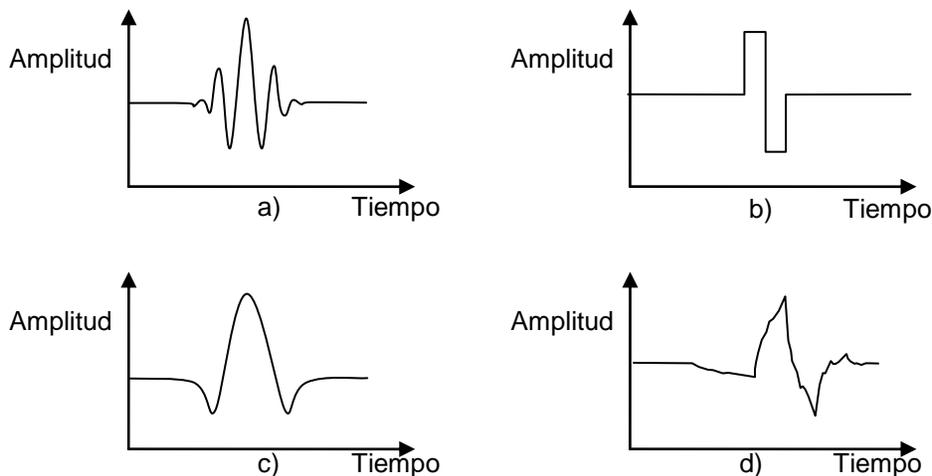


Fig.5.4. Funciones wavelet: a) Morlet, b) Haar, c) Mexican hat y d) Daubechies 4

La función wavelet $\Psi_{s,\tau}(t)$ es una función de energía finita y oscilante que es dilatada y trasladada en el tiempo, es decir, $\Psi(t/s)$ dura s veces la duración de $\Psi(t)$, mientras que la señal $\Psi(t-\tau)$ comienza τ unidades de tiempo después que $\Psi(t)$ (Fig.5.5), por lo que la función wavelet se ve afectada por las dilataciones y traslaciones como lo muestra la ecuación 5.38, donde τ es el factor de traslación y s es el factor de escala, que también afecta el valor del área haciendo que sea constante en todas las dilataciones. Debido a

que la función wavelet no es una función periódica, no guarda información en términos de la frecuencia directamente, en lugar de ello, relaciona la información en términos del factor de escala s , por ello aquí se habla de escalas y no de frecuencias necesariamente. Un valor de s grande esta relacionado a bajas frecuencias y un valor de s pequeño está relacionado a altas frecuencias

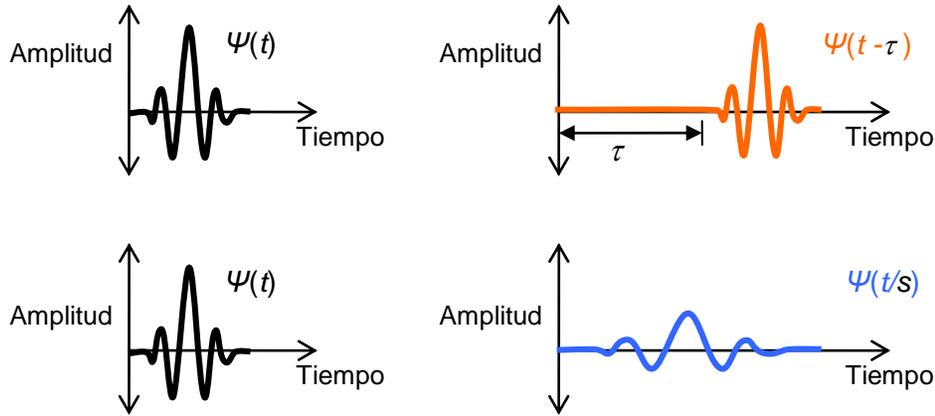


Fig.5.5. Traslación y dilatación de una wavelet.

$$\psi_{s,\tau}(t) = \frac{1}{\sqrt{s}} \psi\left(\frac{t-\tau}{s}\right) \quad \text{Ec. 5.38}$$

La acción de dilatar y trasladar la función $\psi_{s,\tau}(t)$, da como resultado que el ancho de ventana sea más pequeño a altas escalas y más grande a bajas escalas. Con ello se logra una buena resolución en el tiempo en valores altos de s , mientras que a valores bajos de s se logra una buena resolución en la frecuencia, a este tipo de análisis se le llama multirresolución (Fig.5.6).

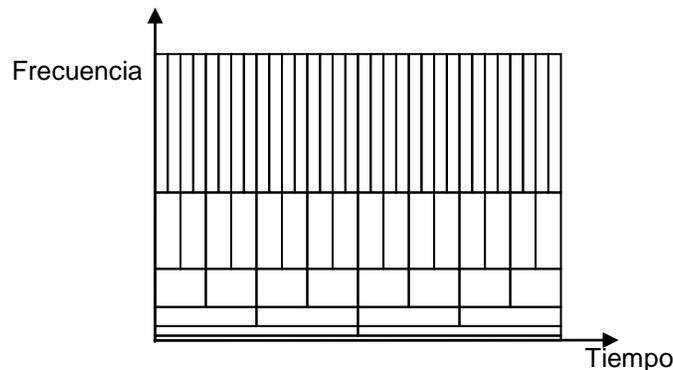


Fig.5.6. Vista del análisis multirresolución.

Al realizar la proyección de la señal sobre las bases se obtendrá $A \psi_{s,\tau}(t)$, donde la amplitud A es el valor de los coeficientes correspondientes de las bases trasladadas y dilatadas.

La idea detrás del análisis por transformadas es que una representación diferente puede resaltar propiedades de una señal que no se ven de manera aislada en la señal original. Debido a ello conocer las propiedades de cada análisis es de importancia, si lo que se desea es encontrar una frecuencia fundamental del sistema, entonces se preferirá la transformada de Fourier. Por otra parte, si se desea conocer el tiempo en que aparece una frecuencia, entonces se requiere la aplicación de transformada wavelet, debido a que proporciona información en términos de la frecuencia y el tiempo simultáneamente. En los procesos químicos lo que se desea conocer es la historia del proceso, para poder predecirlo y controlarlo, por ello es importante realizar un análisis en **el tiempo y la frecuencia simultáneamente**. Recientemente se ha propuesto el uso del análisis multirresolución para el filtrado y extracción de tendencias de las variables de proceso (Bakshi y Stephanopoulos, 1994; Bakhtazad *et al.*, 1999; Nounou y Bakshi, 1999; Jiang *et al.*, 2003).

6. METODOLOGÍA

6.1. MATERIALES Y EQUIPO

Para realizar los experimentos, se solicitaron al cepario del CINVESTAV (Fig 6.1) 2 cepas microbiológicas fermentadoras de productos lácteos: *Streptococcus thermophilus* (CDBB-B-909) y *Lactobacillus acidophilus* (CDBB-B-1026), y se mantuvieron por resiembra en caldo MRS. En la prueba preliminar se empleó como inóculo yogurt natural marca ACTIVIA NATURAL presentación de 1 litro, número de lote L25 04:09.



Fig.6.1. Cepas utilizadas en el estudio.

El medio de cultivo seleccionado para el estudio fue leche comercial de origen vacuno, entera y pasteurizada de la misma marca comercial. En la prueba preliminar se ocupó leche entera comercial marca LALA, numero de lote 06MAY10UT 11 20:14 K07 54MCVGFP. En los experimentos realizados se empleó leche entera comercial marca LALA, numero de lote 28JUL11UC 3 07:19 A29 S3MVMEJF.

Numerosa bibliografía existe respecto al conteo de las unidades formadoras de colonias de *L. acidophilus* (IDF, 1995; Rybka y Kailasapathy, 1996; Dave y Shah, 1996; Tharmaraj, 2003). Sin embargo, en el caso de cultivos combinados, Vinderola y Reinheimer (2000) determinan que el medio M17 es selectivo para el crecimiento de *S. thermophilus* en presencia de *L. acidophilus*, sin embargo también muestran que los medios MRS, T-MRS y G-MRS son parcialmente selectivos a algunas cepas de *S. thermophilus* debido a que existen cepas que son capaces de crecer en dichos medios. Lima *et al.* (2009) y Rybka y Kailasapathy (1996) presentan el medio M-MRS como posible medio diferenciador en mezclas de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, sin especificar si alguna cepa específica de *S. thermophilus* es capaz de crecer en dicho medio. En el presente trabajo se empleó agar MRS para el desarrollo y conteo de colonias de BAL cuando se estudiaron inóculos puros. Cuando se realizó la combinación de las BAL se emplearon los medios selectivos M-MRS para *L. acidophilus* y RCPB para *S. thermophilus* (Tabla 6.1).

Las diluciones se realizaron con agua peptonada (Purwandari *et al.*, 2007), preparándose 360 ml de medio de dilución para realizar los análisis microbiológicos del producto obtenido durante la fermentación, el medio de dilución se depositó en tubos de ensaye (40 tubos con 9 ml). Una vez preparados los medios fueron esterilizados a 121°C (1.118 Kg/cm² de presión) durante 15 minutos (CULTIMED, 2003).

Para realizar el análisis microbiológico de las muestras estudiadas, se dispuso de un laboratorio acondicionado, con material adecuado para realizar practicas de microbiología (Fig 6.2). Donde el material de vidrio del laboratorio fue esterilizado a 121°C durante 15

min en la autoclave marca MARKET FORGE modelo Sterilmatic Sterilizer (Fig 6.3). La medición de pH de las muestras se realizó con un pHmetro marca ORION modelo 420A (Fig 6.4), para calibrarlo se ocuparon soluciones buffer de pH 4 en el limite inferior y de pH 7 en el limite superior.

Tabla 6.1. Formulaciones de los medios utilizados.

	MRS	M-MRS	RCPB	Agua peptonada
Manganeso (II) sulfato	0.05	0.05		
Magnesio sulfato	0.15	0.15		
Tween 80	1	1		
Citrato de amonio	2	2		
di-potasio hidrógeno fosfato	2	2		
L-cisteína clorhidrato			0.5	
Almidón			1	
Azul de prusia			0.03	
Sodio acetato	3	3	3	
Extracto de levadura	4.5	4.5	3	
Extracto de carne	9	9	10	
Peptona	10	10	7.5	10
Agar	11	11	13	
Maltosa		20		
Dextrosa	20		5	
Cloruro de sodio			5	5

*medidas dadas en gr por cada litro de medio



Fig.6.2. Material ocupado en el análisis microbiológico.



Fig.6.3. Autoclave MARKET FORGE modelo Sterilmatic Sterilizer.



Fig.6.4. pHmetro marca ORION.

Para la incubación de placas petri, se ocupó una incubadora (Fig 6.5) ajustada a 36 °C. En la prueba preliminar para incubar los frascos de cultivo, se ocupó una incubadora marca LAB-LINE modelo 417 vip (Fig 6.6),



Fig.6.5. Incubadora utilizada para el cultivo de cajas Petri.



Fig.6.6. incubadora marca LAB-LINE modelo 417 vip utilizada en la prueba preliminar.

Durante la prueba preliminar se determinó que las variaciones de temperatura afectan a las mediciones, por ello para la experimentación se diseñó y construyó un sistema aislado térmicamente que permitió mantener la temperatura en el interior dentro de un rango de temperatura (35 a 37 °C) y al mismo tiempo permite mantener los transductores estáticos en el interior (Fig 6.7). El sistema cuenta además con orificios que permiten la manipulación de frascos en el interior del área. La fuente de calor del sistema es generada por un foco de 70 W dentro en una chaqueta metálica. Adicionalmente al aislamiento del sistema, se realizó el seguimiento de la temperatura en el interior utilizando un medidor de temperatura digital marca HOBO, con dos sensores para medir la temperatura tanto en el interior de la cámara de aislamiento como en un frasco testigo (Fig 6.8).

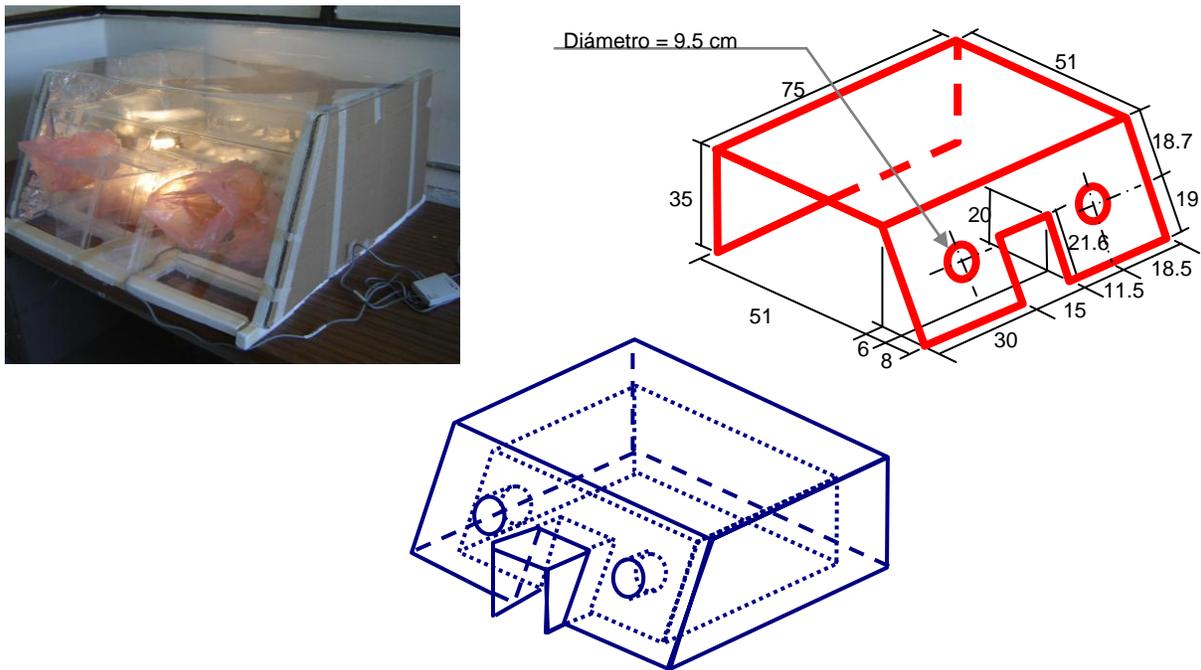


Fig.6.7. Sistema de aislamiento térmico.



Fig.6.8. Termómetro digital marca HOBO.

Las señales ultrasónicas se generaron en el equipo emisor-receptor de ondas ultrasónicas marca OLYMPUS modelo 5058PR (Fig 6.9). Con el fin de evitar que la señal pase por la capa de aire formada en la parte superior de los frascos, se colocaron los sensores lateralmente como se muestra en la Figura 6.10, y se ajustaron con un torquímetro a 5 lb / pulg². La configuración del equipo se muestra en la Tabla 6.2.



Fig.6.9. Equipo emisor-receptor de ondas ultrasónicas marca OLYMPUS.

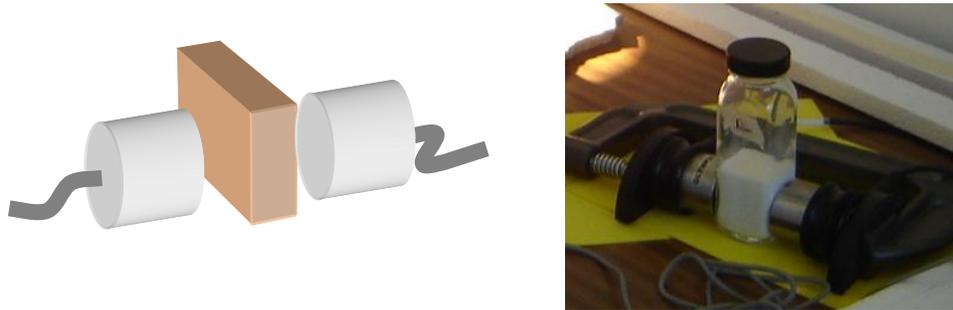


Fig.6.10. Ubicación de los sensores en el contenedor.

Tabla 6.2. Configuración del equipo emisor-receptor 5058PR.

Rep Rate	Damping	Pulse Height	Filters	Attenuator
20 Hz	200Ω	100 V	No	9-20 dB

Los sensores del equipo emisor-receptor son transductores marca PANAMETRICS modelo NDT X1021 de 50 KHz (Fig. 6.11), el cual es capaz de enviar un pulso de compresión (o longitudinal). El tipo de transductor es conocido como *narrowband*, es decir, el análisis de la señal por medio de la transformada de Fourier muestra un espectro en forma de punta de flecha con una frecuencia preferencial del transductor alrededor de 50 KHz.



Fig.6.11. Transductor marca PANAMETRICS modelo NDT X1021

El equipo emisor-receptor 5058PR se conectó al osciloscopio digital marca TEKTRONIX modelo TDS3014C (Fig 6.12), el tamaño de la señal obtenida durante la experimentación fue de 1 centésimo de segundo (1×10^{-2} segundos) con un Δt de 1 microsegundo (1×10^{-6} segundos), la configuración del osciloscopio se muestra en la Tabla 6.3. El tamaño de la señal en la prueba preliminar fue de 0.02 segundos.

Tabla 6.3. Configuración del osciloscopio durante la experimentación.

		Δ	@	Coupling & impedance	sample rate	M	T (delay)	acquisition mode
Ch1	5.00 V	20.0 V	-20.0 V	AC	1.00 Ms/s	1.00 ms	10.0 %	average16
Ch2	10.0 mV	40.0 mV	0.00 V	DC				

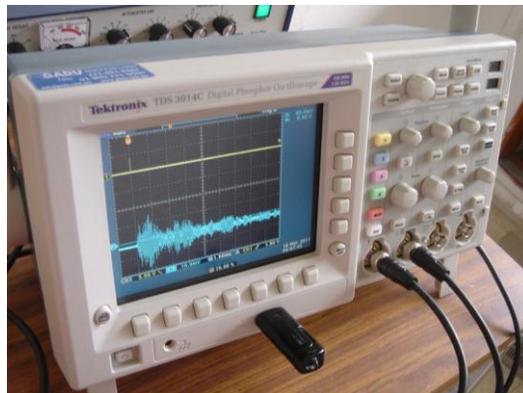


Fig.6.12. Osciloscopio digital marca TEKTRONIX.

El osciloscopio tiene ranura para una memoria USB y los datos obtenidos del equipo se guardaron en archivo EXCEL con extensión .CVS. El orden de conexión entre el equipo emisor-receptor 5058PR y el osciloscopio se muestra en la Figura 6.13. Para el análisis de las señales se utilizó el programa MATLAB.

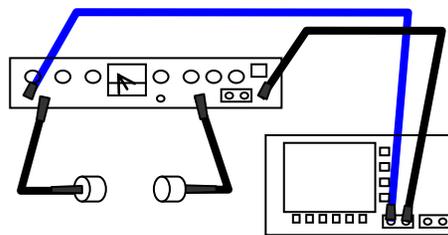


Fig.6.13. Diagrama de conexión.

6.2. PRUEBA PRELIMINAR

Para evaluar el efecto en el desarrollo de las BAL debido a la aplicación de las señales ultrasónicas emitidas por el equipo 5058PR, se compararon propiedades fisicoquímicas de 4 recipientes de un yogurt fermentado que recibieron señales ultrasónicas de 12 minutos de duración en diferentes momentos de su cinética, contra las propiedades de 4 recipientes testigo (Fig 6.14).



Fig.6.14. Recipientes utilizados en la prueba preliminar, de izquierda a derecha: T-1, T-4, R-1, T-3, T-2 y R-3).

Con una probeta graduada se midieron 70 ml de medio de cultivo y se vaciaron en cada uno de los frascos de cultivo (frascos de dilución de capacidad 90 ml), esto se realizó en área estéril, formada por 2 mecheros encendidos a los costados de la mesa de trabajo, posteriormente los frascos se llevaron a la estufa de incubación hasta alcanzar 40 °C. Una vez preparados los recipientes con el medio de cultivo, se realizó la siembra del cultivo microbiológico inoculando 0.5 ml de cultivo microbiológico (1%).

Para demostrar que no existe efecto significativo en la formación de yogurt debido al uso de los ultrasonidos, al finalizar la fermentación se realizó la evaluación de las características físico-químicas del yogurt formado (pH, densidad, viscosidad y esfuerzo cortante)

6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para realizar el estudio se seleccionó un factor que puede influir en la experimentación, el tipo de bacteria láctica a estudiar. En cuanto a las repeticiones y la aleatorización, cada nivel cuenta con al menos 2 repeticiones y se muestra su distribución en la Tabla 6.4. El diseño factorial es del tipo 3¹, siendo éste un modelo de efectos fijos.

Tabla 6.4. Factores y niveles en los experimentos.

Factor	Niveles	Experimentos		
Bacteria	<i>S. thermophilus</i>	SS3	SS4	
	<i>L. acidophilus</i>	LL1	LL2	LL7
	Combinación	SL5	SL6	

La realización de cada experimento se compone de la preparación de un inóculo, preparación de materiales y muestras, colocación del experimento y obtención de la información (Fig. 6.15).

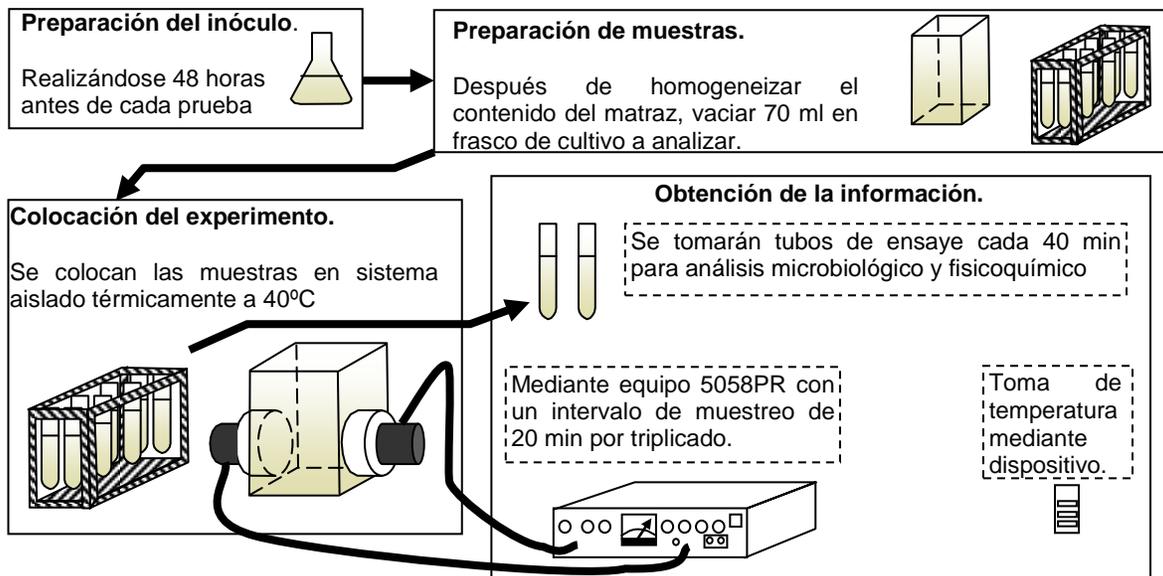


Fig.6.15. Secciones principales del experimento.

PREPARACIÓN DEL INÓCULO.

El inóculo se preparó a partir de las muestras mantenidas en caja petri a 4 °C, colocando 4 colonias en 7 ml de leche manteniendo 38-40°C durante 24 horas, posteriormente se vaciaron los 7 ml en un matraz con 70 ml de leche y se vuelve a incubar 24 horas a 40°C. Para asegurar la viabilidad de las colonias en mantenimiento, estas se resiembran cada 2 semanas en agar MRS y en caldo MRS.

PREPARACIÓN DE MATERIALES Y MUESTRAS.

Se preparó la solución colocando 50 ml de inóculo por cada 450 de leche al momento de iniciar las cinéticas, de la solución total se tomaron 360 ml para 40 tubos de ensayo. El material estéril se preparó un día antes, mientras los medios sólidos a ocupar se prepararon 2 días antes.

COLOCACIÓN DEL EXPERIMENTO.

Una vez preparadas las muestras se colocaron dentro de la cámara, los sensores se colocaron mediante torquímetro a 5 lb/pulg². También se colocaron los 40 tubos de ensayo con la muestra y el frasco testigo en el que se midió la temperatura.

En pruebas posteriores cambió la forma del experimento, se colocaron tanto la leche como los materiales dentro de la cámara por una hora para alcanzar una temperatura estable y posteriormente se hizo la inoculación de la muestra (respetando la proporción utilizada). La inoculación dentro del frasco de cultivo se hizo mediante el uso de catéter y jeringa para evitar mover el frasco que se encontraba sujeto al torquímetro.

OBTENCIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Las señales ultrasónicas se obtuvieron con ayuda del osciloscopio (en formato .CVS), las lecturas fueron tomadas por triplicado cada 20 minutos, la duración de la señal es de 0.01 segundos con un Δt de 1 microsegundo, dando en total 10 000 puntos por señal.

Cada 40 minutos se tomó un tubo de ensaye para realizar el análisis microbiológico y para la toma de pH. Debido a la falta de un operador, sólo en los experimentos identificados como SL6 y LL7 se tomaron dos tubos cada 40 minutos, donde el tubo adicional fue utilizado para obtener datos de reometría del experimento.

Østlie *et al.* (2005) y Purwandari *et al.* (2007) han estudiado dichas bacterias y existen cinéticas tanto de pH como de unidades formadoras de colonias hasta alcanzar un valor de 4.5. De acuerdo a Østlie *et al.* (2005) el valor de pH para el *L. acidophilus* se espera que llegue a un pH de 4.5 al cabo de 18 horas a 40°C. Mientras que el *S. thermophilus* se espera que alcance el valor de pH de 4.5 entre 9 y 10 horas a 40°C (Purwandari *et al.*, 2007 y Lund *et al.*, 2000). Para la mezcla de microorganismos *L. acidophilus* y *S. thermophilus* se espera que el valor de pH de 4.5 se alcance en un lapso de 6 a 7 horas (Lund *et al.*, 2000).

El valor de pH es un indicador de la cantidad de ácido láctico formado. Sin embargo, el ácido láctico es una molécula de bajo peso molecular, y no se espera que se vea de manera clara en el análisis ultrasónico. Debido a que *L. acidophilus* puede consumir los dos monosacáridos de la lactosa (glucosa y galactosa) se espera que exista una mayor velocidad de generación del mismo, a diferencia de *S. thermophilus* que solo es capaz de aprovechar la glucosa.

La cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) son un buen indicador de la densidad de microorganismos viables en el medio estudiado, debido a que las bacterias tienden a reproducirse y a agruparse, se puede esperar que afecte la velocidad de propagación de la señal ultrasónica

El tubo de ensaye destinado al análisis microbiológico (Fig. 6.15) se considerará como solución 10^0 , de este tubo se realizarán las diluciones 10^{-6} y 10^{-8} . Una vez diluida la muestra, se tomaron 2 alícuotas de 0.1 ml de la solución 10^{-6} (o 10^{-8} según sea el caso) y se vacían en cajas petri (Fig. 6.16), colocando uniformemente la muestra mediante una varilla de vidrio (previamente esterilizada) en un ambiente de asepsia (plaqueado).

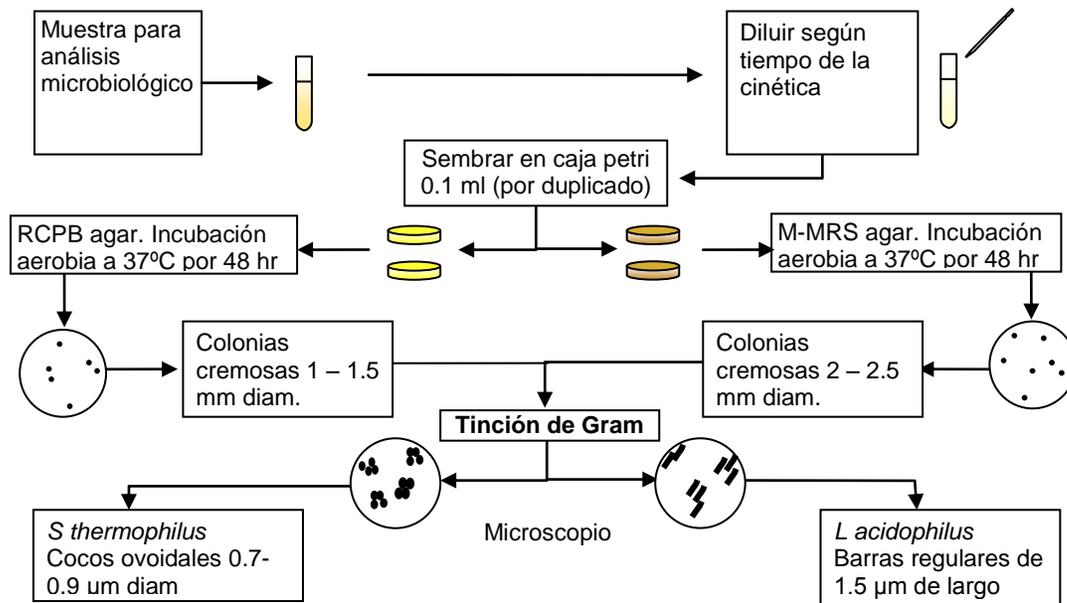


Figura 6.16. Metodología de análisis microbiológico

Las diluciones se realizarán en agua peptonada en área estéril y se sembrarán en caja petri por duplicado de acuerdo a la metodología descrita en la Figura 6.17.

La cinética de fermentación presentada por Østlie *et al.* (2005) muestra que el número de UFC durante la fermentación empieza en el orden de 3×10^7 UFC y termina en el orden de 1×10^9 UFC para la bacteria *L. acidophilus*. Merck (1982) indica que para conteo de UFC en caja petri solo se consideran aquellas que presenten un mínimo de 20 colonias visibles y un máximo de 300 UFC. Por lo tanto se consideran hacer al menos 6 diluciones para realizar el plaqueo durante las primeras 3 horas de la cinética, y 8 diluciones para las siguientes horas.

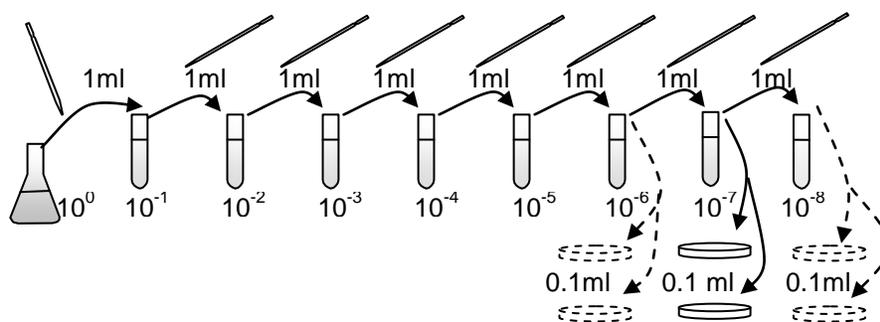


Figura 6.17. Técnica de diluciones

Trascurridos 48 horas de incubación a 37°C, se revisan las cajas petri, seleccionando aquellas que tuvieran un mínimo de 30 colonias y no más de 300 colonias. Se cuantificó el número de colonias en un contador de colonias y se reportó el promedio de las cajas de la misma dilución (de la original y su duplicado) multiplicando por el factor de dilución (la inversa de la dilución cuyas placas han sido seleccionadas), dando el valor obtenido como

el recuento estándar en placa estimado por gramo o por ml de alimento, según corresponda.

Para dar los valores del recuento estándar en placa, deben utilizarse únicamente dos cifras significativas. Estas dos cifras corresponden a los dígitos primero y segundo (empezando por la izquierda) de la media de las colonias halladas. Los dígitos restantes tienen que ser sustituidos por ceros. Si el tercer dígito es superior a 5, este se redondea. Por ejemplo, si el valor calculado fue de 56 500, este ha de darse como 57×10^3 (Merck, 1982).

7. RESULTADOS

7.1. PRUEBA PRELIMINAR

Durante la prueba preliminar se tomaron señales ultrasónicas de los frascos marcados como R1, R3, T1, T2, T3 y T4 (Fig.7.1 a 7.6), la señal obtenida del frasco R2 se descartó debido a una fractura ocurrida en el frasco. Las señales fueron tomadas en los frascos bajo las siguientes condiciones: frasco sin leche (-s), frasco con leche sola (-L), frasco con inóculo en tiempo cero (-0), frasco al minuto 346 de la fermentación (-346), y en algunos frascos fueron tomadas señales en intervalos de tiempo dentro de la fermentación. Así mismo se graficó el pulso de entrada de los distintos experimentos (Fig.7.7). La presión de los transductores sobre los frascos no fue controlada en esta prueba.

Con la finalidad de evaluar el efecto de las señales en el desarrollo de las BAL se seleccionaron 2 grupos, el primero de ellos recibió señales ultrasónicas de 12 min de duración en distintos momentos de la cinética (frascos T2, R1 y R3), el segundo grupo (frascos T1, T3 y T4) recibió la señal inicial y la final, el frasco R4 no recibió ninguna señal debido a que se colocó en un matraz Erlenmeyer lo que imposibilitó la colocación de sensores.

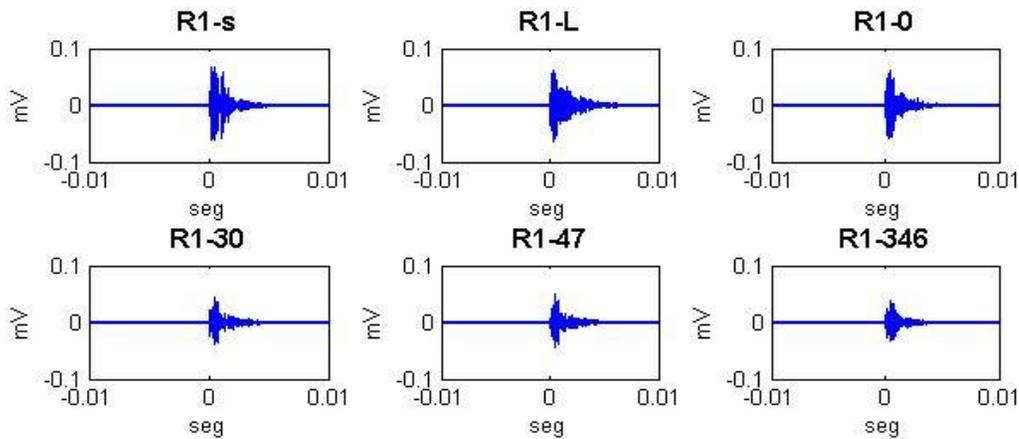


Fig.7.1. Señales ultrasónicas obtenidas en el frasco R1.

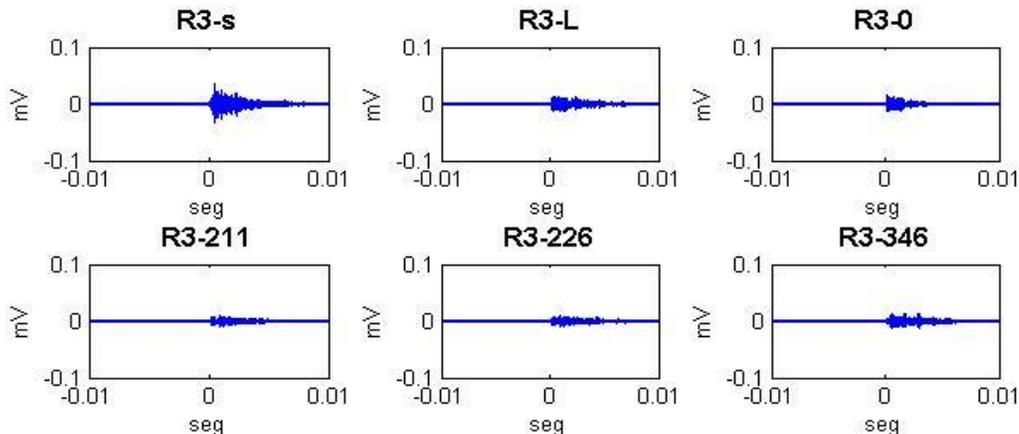


Fig.7.2. Señales ultrasónicas obtenidas en el frasco R3.

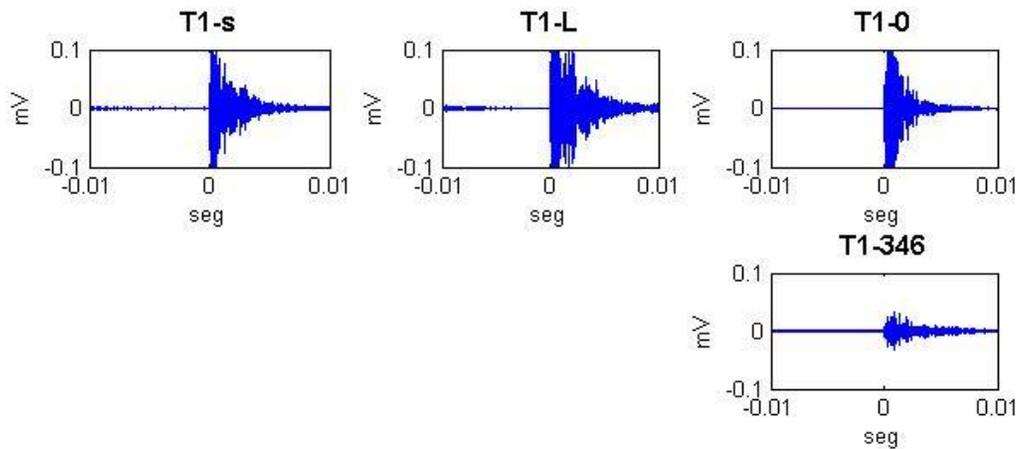


Fig.7.3. Señales ultrasónicas obtenidas en el frasco T1.

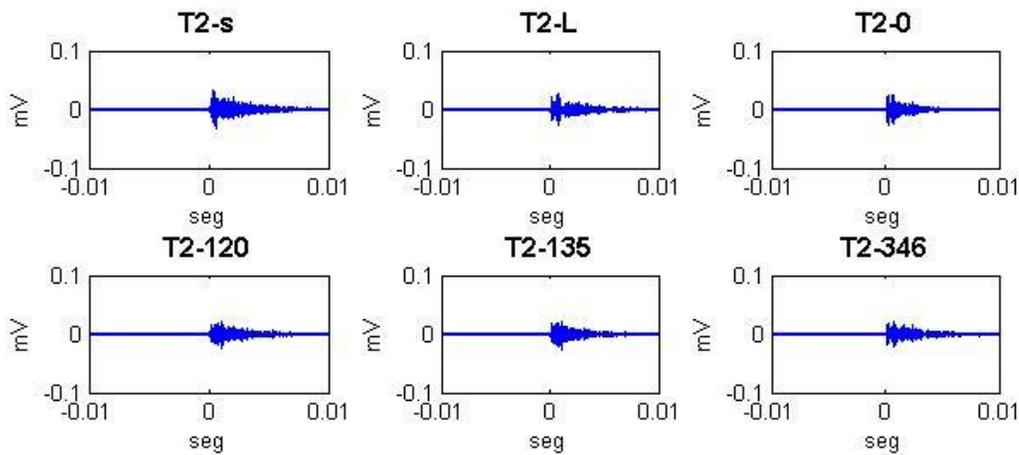


Fig.7.4. Señales ultrasónicas obtenidas en el frasco T2.

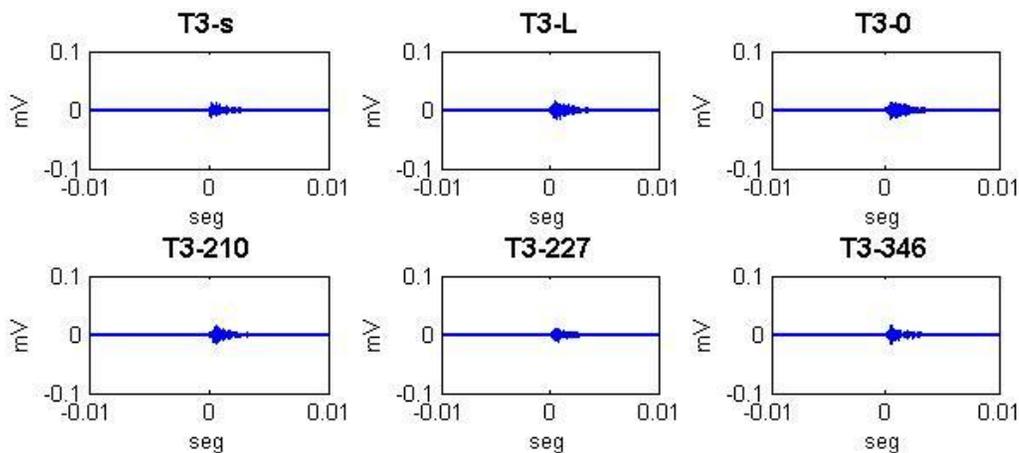


Fig.7.5. Señales ultrasónicas obtenidas en el frasco T3.

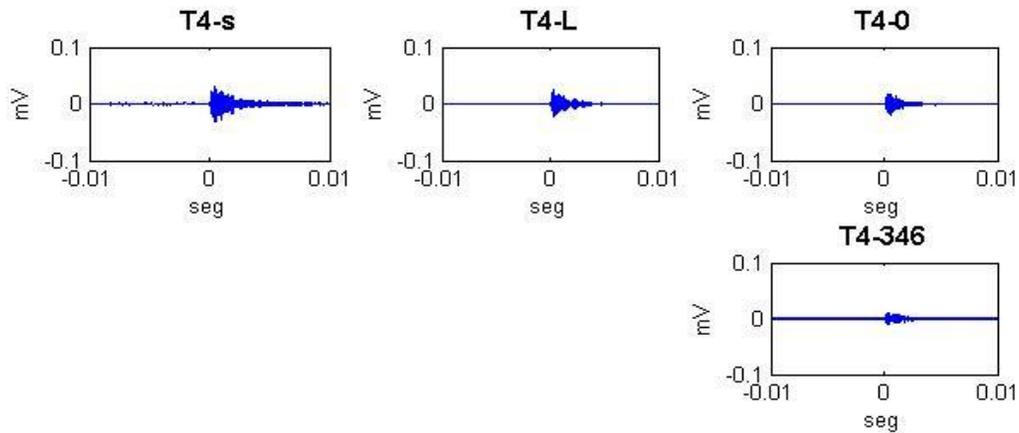


Fig.7.6. Señales ultrasónicas obtenidas en el frasco T4.

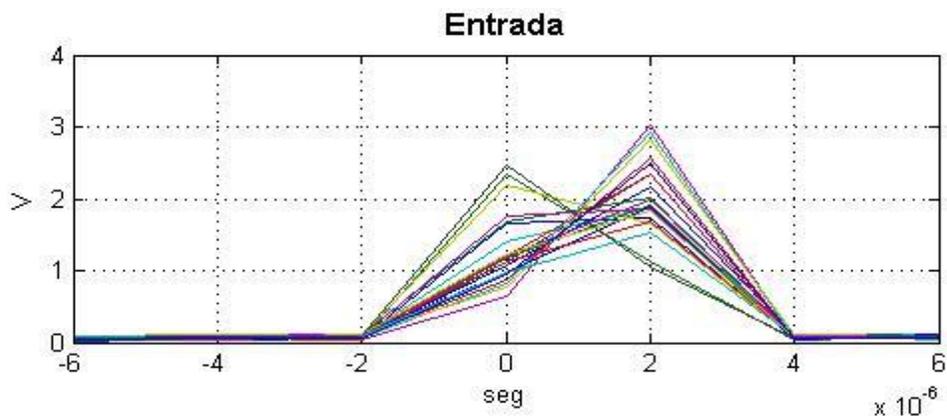


Fig.7.7. Señales de entrada en los distintos experimentos.

Se realizaron comparaciones de todas las señales obtenidas por cada frasco, en los primeros 1×10^{-4} seg de la señal después de emitido el pulso (Figura 7.8), observándose que el tiempo de llegada de la señal varía con el frasco. También se observa mayor nitidez de la señal en los frascos R1 y T1, en los cuales es necesario un cambio de escala para observar la amplitud de la señal, mientras que el resto de las señales se observan con demasiada interferencia o muy atenuadas.

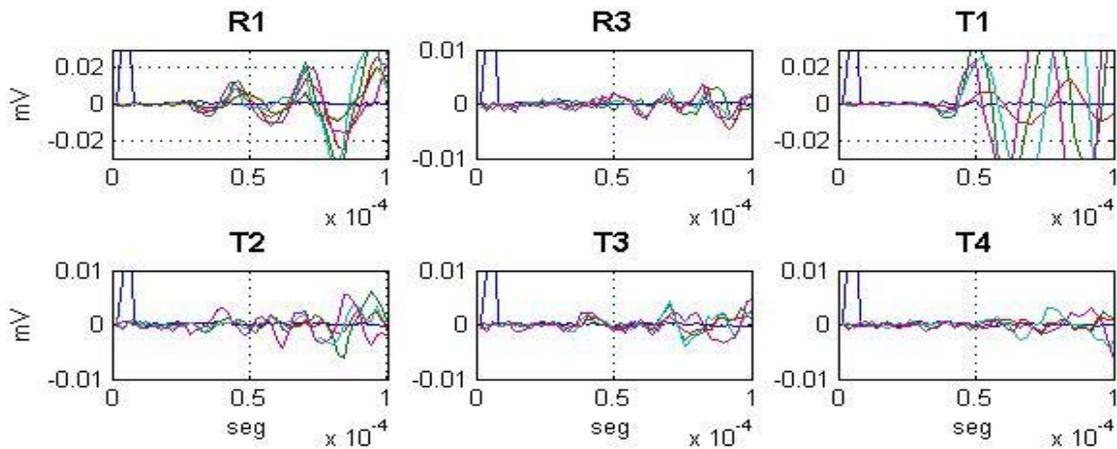


Fig.7.8. Primeros arribos de la señal obtenidas durante la prueba preliminar.

La Figura 7.9 muestra el comportamiento de la viscosidad y el esfuerzo cortante del yogurt formado a diferentes velocidades de corte. Las tendencias de color negro corresponden a los frascos que no recibieron la exposición prolongada de ultrasonidos, mientras que los de color rojo representan a los que si recibieron el tratamiento. La tendencia de color café corresponde al yogurt que se floculó por agitación excesiva.

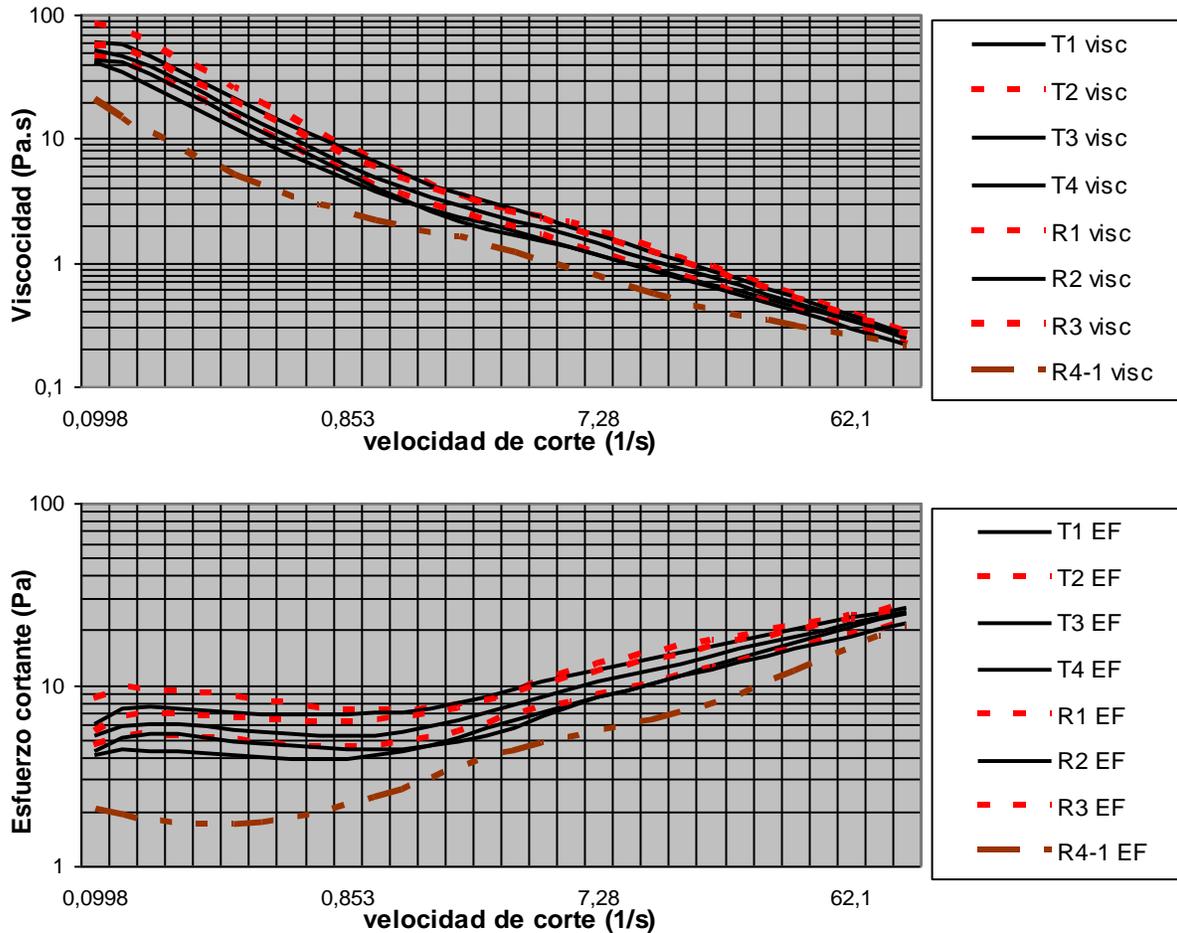


Figura 7.9. Viscosidad (arriba) y esfuerzo cortante (abajo) a diferentes velocidades de corte.

La Tabla 7.1 muestra las densidades del yogurt obtenido al final de la fermentación. Para el análisis estadístico se consideran 3 tratamientos: con exposición prolongada de ultrasonidos, sin exposición a ultrasonidos y cabe recordar que el yogurt formado en el frasco R4 se encuentra “cortado” (floculado), por tanto se considera que es otro tratamiento (Tabla 7.2). La Tabla 7.3 muestra los valores de pH del yogurt obtenido al final de la fermentación. Para el análisis estadístico se consideran los 3 tratamientos: con exposición prolongada de ultrasonidos, sin exposición y “cortado” (Tabla 7.4).

Tabla 7.1. Densidad obtenida por frasco en la prueba preliminar.

FRASCO	T1	T2	T3	T4	R1	R2	R3	R4
Densidad gr/ml	1.024	1.057	1.024	1.057	1.059	1.048	1.032	1.038

Tabla 7.2. Densidad obtenida por tratamiento en la prueba preliminar

TRATAMIENTOS		
Sin ultrasonido	Con ultrasonido	Floculado
1.024	1.032	1.038
1.024	1.059	
1.057	1.057	
1.048		

Tabla 7.3. pH obtenido por frasco en la prueba preliminar.

FRASCO	T1	T2	T3	T4	R1	R2	R3	R4
pH	4.42	4.48	4.43	4.44	4.37	4.43	4.4	4.37

Tabla 7.4. pH obtenido por tratamiento en la prueba preliminar

TRATAMIENTOS PROPUESTOS		
Sin ultrasonido	Con ultrasonido	Cortado
4.42	4.48	4.37
4.43	4.37	
4.44	4.4	
4.43		

7.2. EXPERIMENTOS REALIZADOS

De la prueba preliminar se observa que el frasco marcado como T-1 permite el paso de una señal de mayor amplitud (Fig.7.3), por su parte, el frasco R-1 es el segundo frasco que permite el paso de la señal (Fig.7.1) y además posee un tamaño en la abertura superior mas grande (Fig.6.14) que permite una mejor manipulación para colocar las muestras. Para minimizar posibles causas de variación se seleccionó el frasco R-1 para realizar los experimentos. Cada señal de los distintos experimentos fueron señalados con un identificador compuesto por la inicial de la bacteria estudiada, el número de experimento y el minuto de la fermentación, en la Tabla 7.5 se muestran el número de señales obtenidas para cada experimento.

Tabla 7.5. Características de los experimentos realizados.

No. de experimento	Microorganismos presentes	Identificador	Minutos obtenidos	No. de lecturas
1	<i>L acidophilus</i>	LL1	440	22
2	<i>L acidophilus</i>	LL2	580	29
7	<i>L acidophilus</i>	LL7	500	25
3	<i>S thermophilus</i>	SS3	480	24
4	<i>S thermophilus</i>	SS4	500	25
5	<i>L acidophilus</i> y <i>S thermophilus</i>	SL5	680	34
6	<i>L acidophilus</i> y <i>S thermophilus</i>	SL6	500	25

7.2.1. VARIACION DE TEMPERATURA

Los registros de temperatura muestran que sólo el experimento LL1 tiene un comportamiento significativamente diferente. El resto de los experimentos muestra una variabilidad de la temperatura mucho menor, debido a que se realizó la inoculación después de hora y media de haber encendido el equipo.

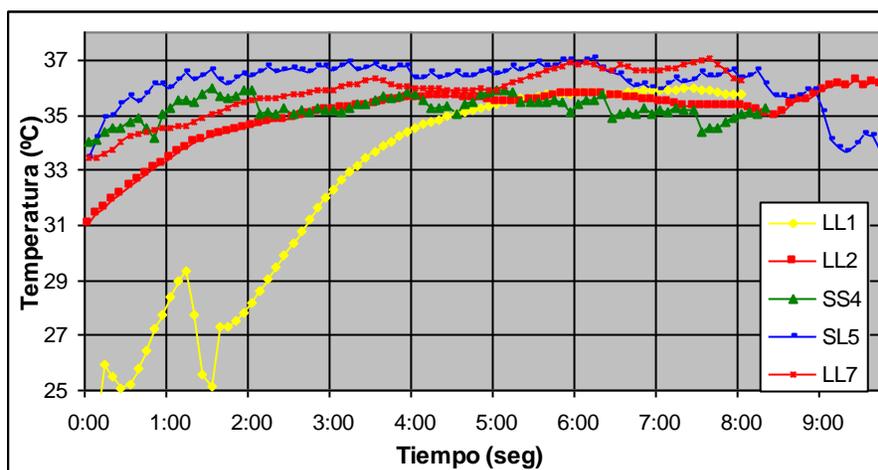


Figura 7.10. Variación de temperatura en cada experimento.

7.2.2. CURVAS DE pH

En las curvas de pH obtenidas (Fig 7.11) se observa que el pH inicial del experimento LL1 tiene una diferencia significativa con respecto a las otras curvas, esta diferencia inicial se atribuye a que el pH esta en función de la temperatura y no es la misma temperatura inicial en el experimento LL1 con respecto a los demás experimentos. En el experimento LL1 el inóculo fue adicionado desde el inicio, donde la temperatura de la muestra estaba cerca de 25°C, y las lecturas fueron tomadas a partir de ese instante. En el resto de los experimentos el inoculo se realizó una hora y media después, cuando la temperatura estaba cerca de 35°C y cuya variación de temperatura no fue tan significativa durante el resto del experimento.

Incluso la forma de la curva de pH de LL1 es diferente respecto a las demás debido a que mantiene el pH inicial un tiempo mayor, debido a que las condiciones de temperatura no fueron las ideales cuando fueron inoculadas las bacterias necesitan un tiempo de adaptación mucho mayor. Se esperaban cambios mayores al variar las BAL presentes en cada experimento, contando con diferentes curvas de pH dependiendo de la bacteria, sin embargo, ocurre que las curvas obtenidas tienen un coeficiente de correlación muy similar entre ellas.

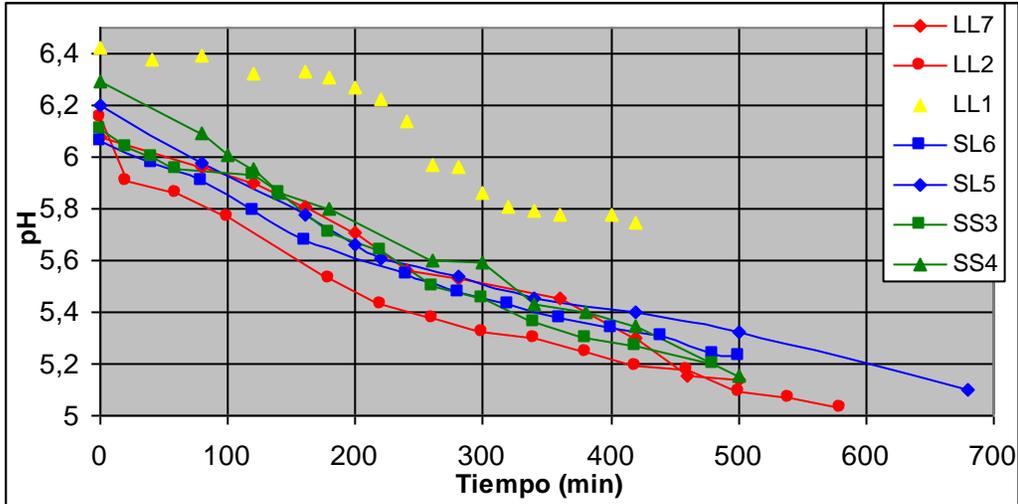


Figura 7.11. Curvas de pH obtenidas durante la experimentación.

7.2.3. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Debido a que en los experimentos no se logró una adecuada diferenciación de las colonias en los medios M-MRS y RCPB, se tomaron en consideración solo el conteo de colonias en medio MRS (Fig.7.12). La Figura 7.13 muestra los valores obtenidos para cada una de las cinéticas realizadas.

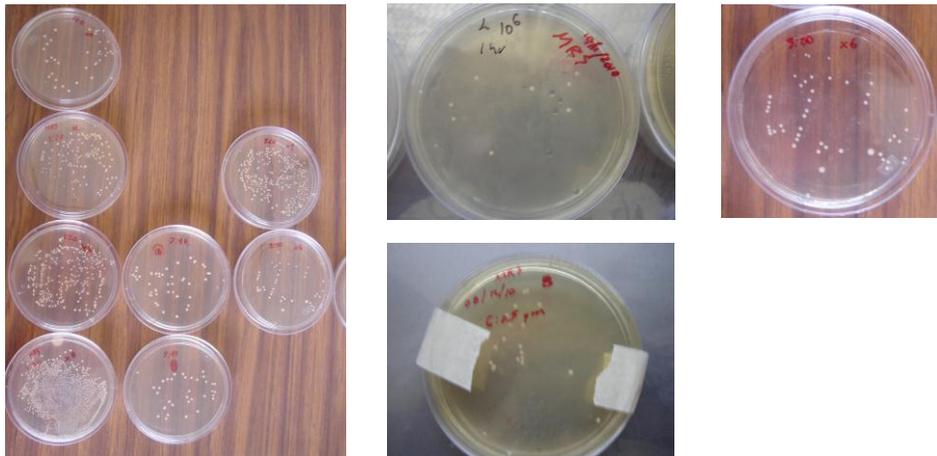


Figura 7.12. Colonias desarrolladas en medio MRS.

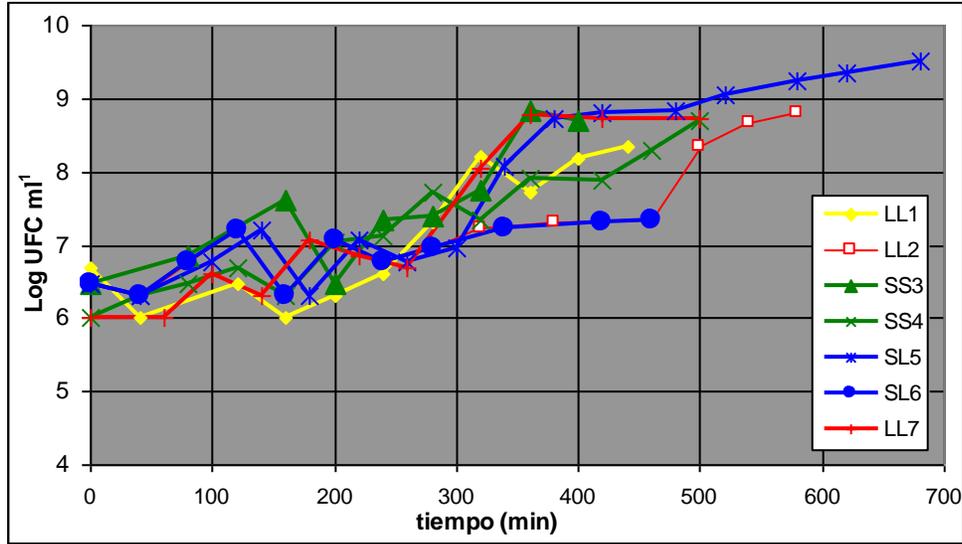


Figura 7.13. Cinéticas de crecimiento para cada experimento.

7.2.4. SEÑALES ULTRASÓNICAS DE LA EXPERIMENTACIÓN

El análisis sobre el pulso de entrada muestra que tiene un máximo de 4.05156 V, un mínimo de 3.92813 V, con un promedio de 3,9838 V, y una desviación estándar de 0.021128905. Por lo que se puede considerar uniforme la señal de excitación y se hace innecesaria una deconvolución previa de la señal obtenida.

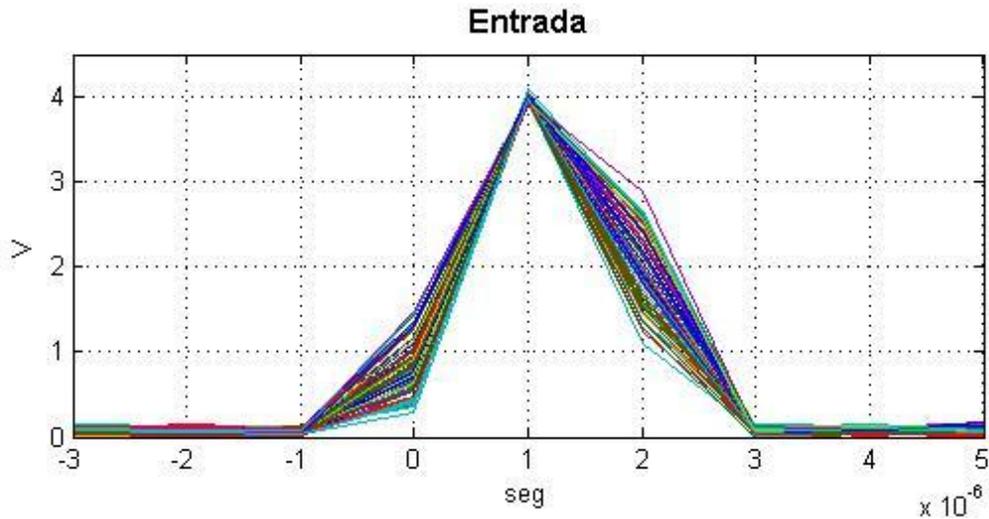


Figura 7.14. Diferentes pulsos de entrada obtenidos durante la experimentación.

Los archivos .CVS obtenidos fueron preprocesados en el programa MATLAB, donde se modificó la línea base y se normalizaron en tiempo considerando como tiempo cero el instante en el que se envió el pulso, con ello se obtuvieron las gráficas de la Figura 7.15. En la grafica se observan las señales de cada experimento obtenidas en el minuto 120, se seleccionó este tiempo debido a que la variación de temperatura después de este tiempo es mínima (Fig 7.10).

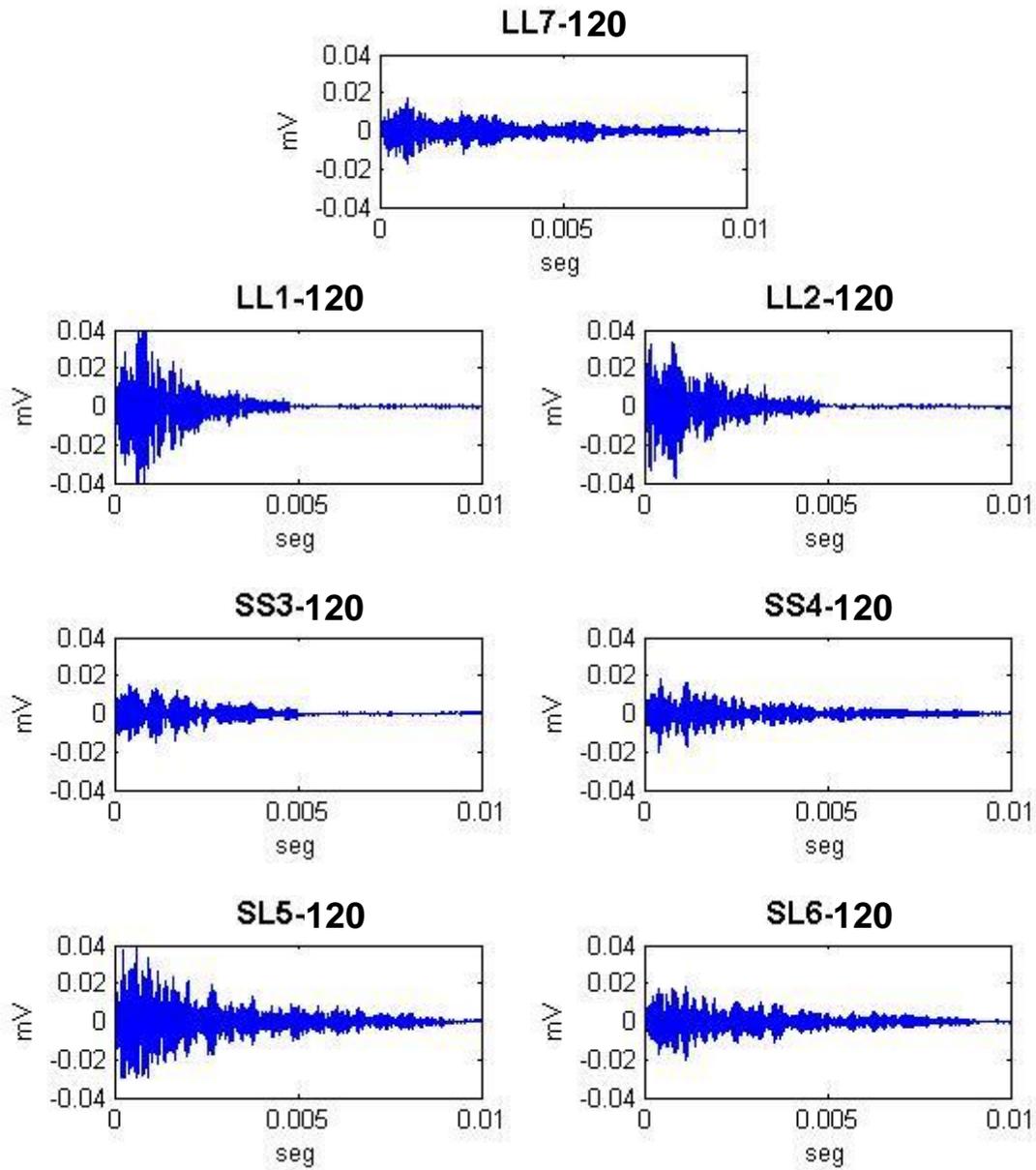


Figura 7.15. Señales obtenidas por experimento en el minuto 120.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

8.1. ANÁLISIS DE LA PRUEBA PRELIMINAR

En las señales obtenidas en la prueba preliminar (Fig.7.1 a 7.6) se observa que existe similitud en la amplitud de las señales que pertenecen a un solo tipo de frasco, ello se atribuye a que las diferentes texturas y espesores de la pared de cada frasco afectan de manera única la propagación de la señal. En cuanto a la señal de entrada, la grafica del pulso de entrada en la prueba preliminar (Fig 7.7) mostró un valor de varianza muy alto, sin embargo en los experimentos realizados posteriormente se minimizó la variabilidad (Fig 7.14).

La superficie de contacto también afecta a las características de la señal, la rugosidad de la superficie afecta de dos maneras: si la superficie tiene demasiadas protuberancias, la señal presentará una gran atenuación debido a la capa de aire que se encuentra entre el sensor y el frasco, los frascos con paredes mas lisas corresponden a los identificados como R1 y T1 y en ellos se observa una señal más intensa que en el resto. Además si la superficie presenta protuberancias demasiado irregulares, impedirá la posible repetición de condiciones al colocar los sensores.

Para demostrar que no existe efecto significativo en la formación de yogurt debido al uso de los ultrasonidos, al finalizar la fermentación se realizó la evaluación de las características físico-químicas del yogurt formado (pH, densidad, viscosidad y esfuerzo cortante), realizando un análisis estadístico para el pH y la densidad, el estadístico empleado fue una prueba de medias Tukey con α 0.05 (en el programa SAS) con un procedimiento GLM (Modelo Lineal General, por sus siglas en ingles) debido a que los tratamientos tienen diferentes números de repeticiones. Considerando un juego de hipótesis donde H_0 indica que “el efecto de todos los tratamientos es el mismo” y H_a indica que “al menos el efecto de un tratamiento es diferente”, el análisis GLM de la variable densidad con un α de 0.5 da como resultado la Tabla 8.1, donde se concluye que el efecto de todos los tratamientos es el mismo, por lo tanto no existe efecto significativo de los tratamientos en la densidad del yogurt

Tabla 8.1. Análisis de suma de cuadrados de la variable densidad.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.00022932	0.00011466	0.43	0.6702
Error	5	0.00132108	0.00026422		
Total	7	0.00155040			

Para el análisis del pH de las muestras, se realizó otro análisis estadístico con un α de 0.5 con los mismos H_a y H_0 , donde se obtiene la Tabla 8.2. Donde se concluye que al menos el efecto de algún tratamiento es diferente, por lo tanto existe efecto significativo de algún tratamiento en el pH del yogurt, y debido a que existe al menos un tratamiento cuya densidad es significativamente diferente del resto, se realiza una prueba de medias para identificarlo.

Tabla 8.2. Análisis de suma de cuadrados de la variable pH

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	0.00288333	0.00144167	1.08	0.4072
Error	5	0.00666667	0.00133333		
Total	7	0.00955000			

La prueba de medias Tukey para la variable pH permite obtener los datos de la Tabla 8.3 con los que se calcula la diferencia mínima significativa y se elabora la Tabla 8.4, en la que se observa que existe una diferencia significativa del yogurt floculado en términos del pH.

Tabla 8.3. Valores obtenidos para el cálculo de la diferencia mínima significativa.

Prueba del rango estudentizado de Tukey	
Alfa	0.5
Grados de libertad del error	5
Cuadrado medio del error	0.001333
Valor crítico del rango estudentizado	1.70496
Media armónica de tamaño de celdas	1.894737
Diferencia significativa mínima	0.0452

NOTA: Los tamaños de las celdas no son iguales.

Tabla 8.4. Resultado de la prueba de medias para la variable pH.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	4.43000	4	Sin ultrasonido
A	4.41667	3	Con exposición
B	4.37000	1	Yogurt cortado

Para el análisis de las curvas de viscosidad, se generaron curvas promedios, una correspondiente a las que recibieron mediciones y otra correspondiente a aquellas que no recibieron. La comparación se realizó calculando el coeficiente de correlación entre las curvas y cada uno de los promedios, obteniéndose que la curva del promedio de la viscosidad de los frascos que recibieron mediciones ultrasónicas tiene un valor de correlación superior a 0.999 con respecto a las curvas de los frascos que no lo recibieron y viceversa. La curva de viscosidad perteneciente al frasco R4 con yogurt floculado es ligeramente diferente presentando un coeficiente de correlación de 0.98 (Fig. 7.9). Para el análisis de las curvas de esfuerzo cortante, se realizó el mismo procedimiento, observándose el mismo comportamiento que en las curvas de viscosidad y cuyo coeficiente de correlación entre las curvas es superior a 0.99. De igual forma, la curva perteneciente al frasco R4 con yogurt floculado tiene un coeficiente de correlación ligeramente inferior al resto (0.96).

Al realizar el análisis de las transformadas de Fourier de las señales obtenidas en la prueba preliminar, se observa que las señales pertenecientes al frasco T-1 poseen las mayores amplitudes (Fig 8.1 a 8.6). Al igual que en las señales obtenidas en la prueba preliminar, en sus transformadas de Fourier se observa congruencia de las señales que pertenecen a un mismo frasco. Aun cuando se observan amplitudes de consideración en frecuencias alrededor de 120 y 160 KHz, solo se estudiarán las frecuencias en un rango de 25 a 75 KHz debido a que la frecuencia preferencial de la señal que el transductor

envía se encuentra alrededor de 50 KHz y frecuencias fuera de ese rango se consideran como ruidos o perturbaciones.

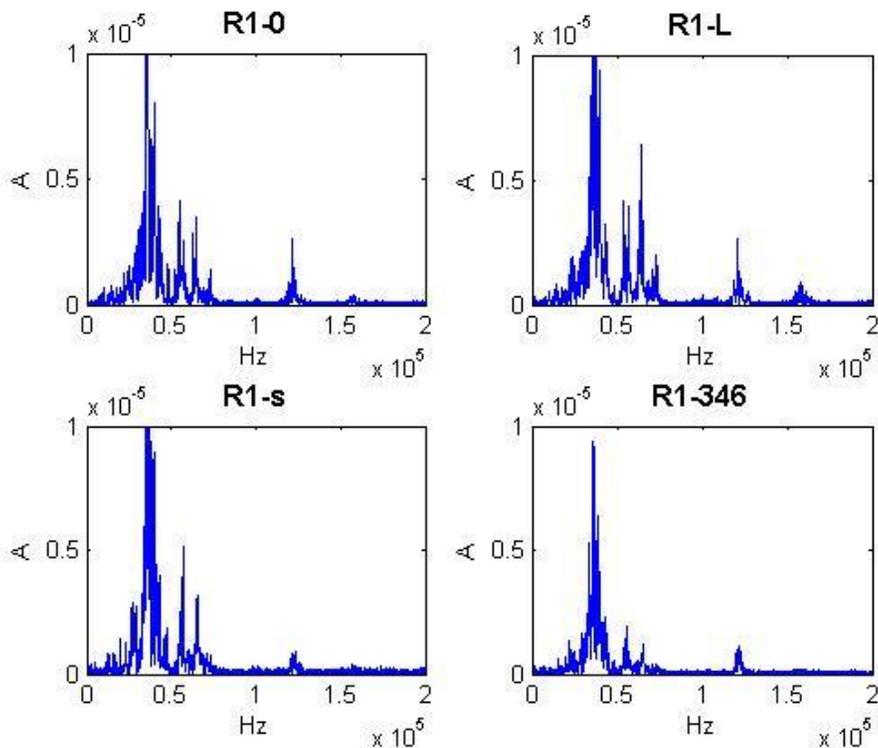


Fig.8.1. Transformada de Fourier de las señales pertenecientes al frasco R1.

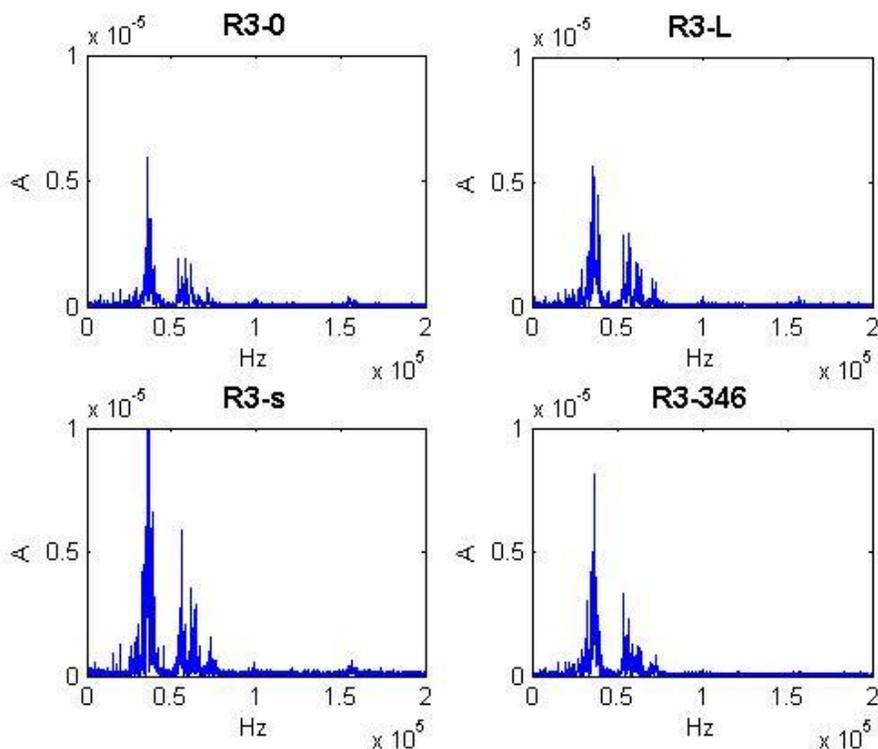


Fig.8.2. Transformada de Fourier de las señales pertenecientes al frasco R3.

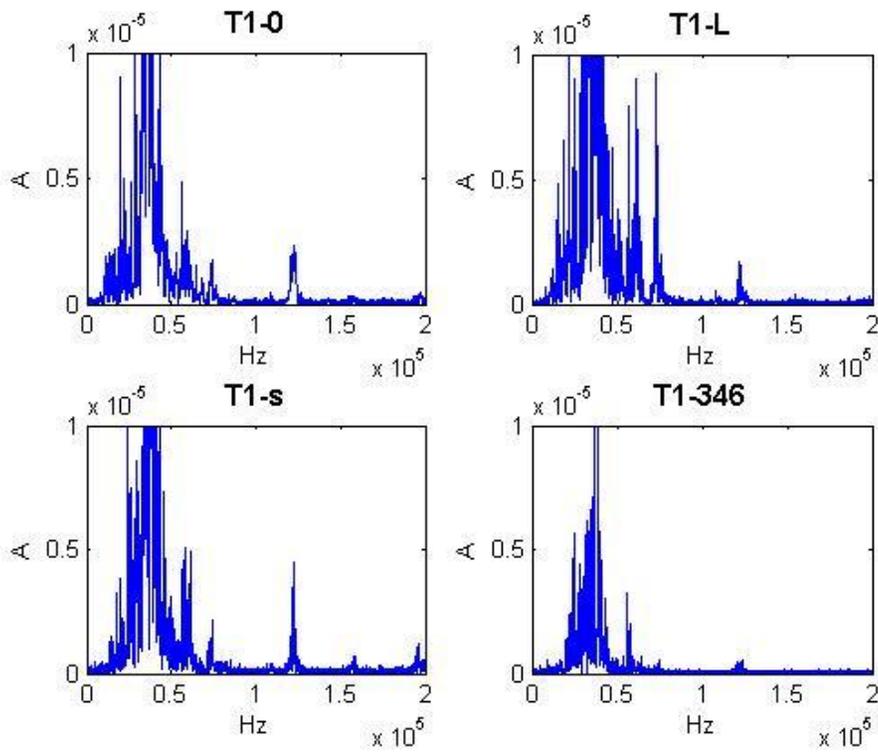


Fig.8.3. Transformada de Fourier de las señales pertenecientes al frasco T1.

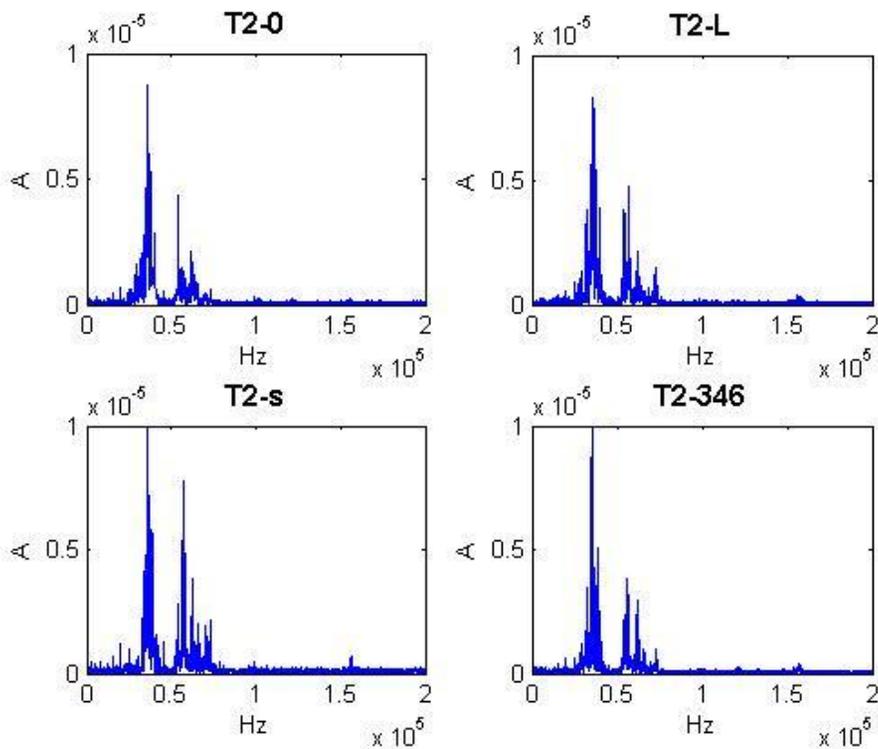


Fig.8.4. Transformada de Fourier de las señales pertenecientes al frasco T2.

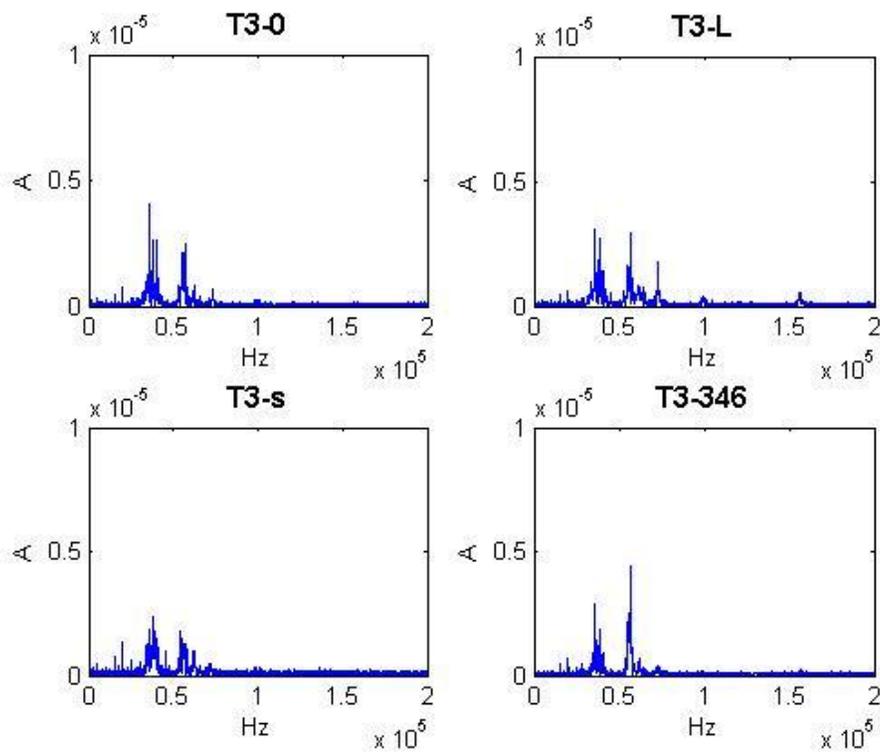


Fig.8.5. Transformada de Fourier de las señales pertenecientes al frasco T3.

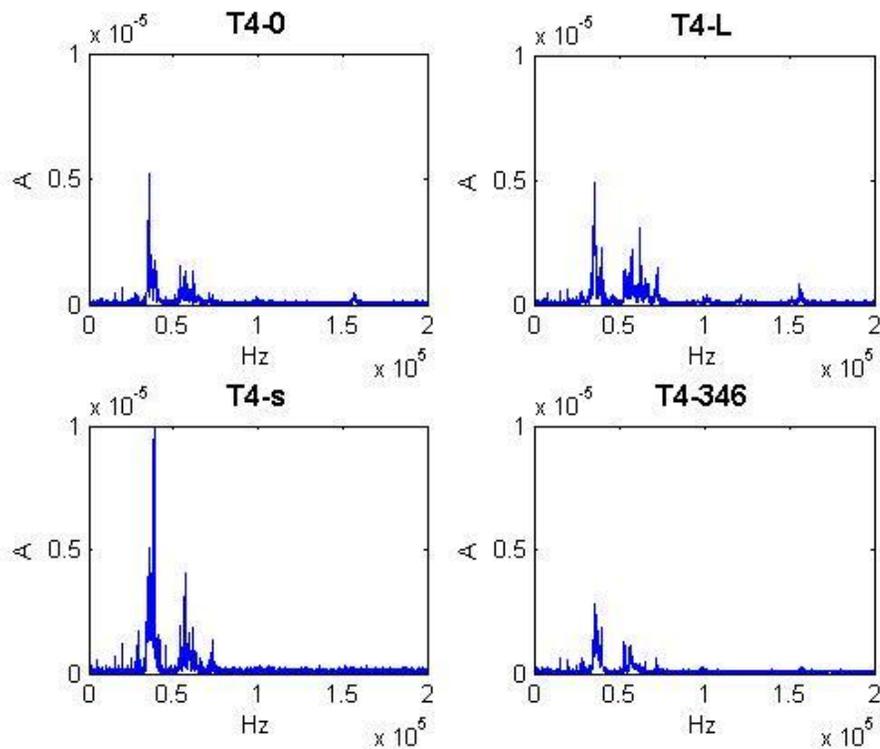


Fig.8.6. Transformada de Fourier de las señales pertenecientes al frasco T4.

8.2. ANÁLISIS DE LAS SEÑALES OBTENIDAS EN LA EXPERIMENTACIÓN

8.2.1. ANÁLISIS EN EL TIEMPO

Las señales obtenidas durante la fermentación en cada experimento se analizaron en el tiempo, en algunos experimentos se observa mayor variabilidad de la amplitud de la señal que otros. Considerando 3 intervalos de tiempo (Fig 8.7 a Fig. 8.13), el conjunto de señales se comporta de manera similar en los primeros instantes de la señal (de 0 a 2×10^{-4} seg) a través del tiempo de la fermentación, tienen un coeficiente de correlación de entre 0.998 y 0.975 dependiendo del experimento.

Posteriormente en el tiempo de la señal (de 8 a 10×10^{-4} seg), se observan cambios significativos en su amplitud a través del tiempo de la fermentación aunque aún mantienen un alto grado de correlación, desde 0.924 hasta 0.844 (con excepción de LL7).

Al observar tiempos de la señal de 1.2 a 1.4×10^{-3} seg, se observa que en la mayoría de los experimentos (con excepción de LL7), las amplitudes de la señal a través del tiempo de fermentación cambian demasiado, e incluso las señales tienen un bajo coeficiente de correlación en un rango de 0.678 a 0.546.

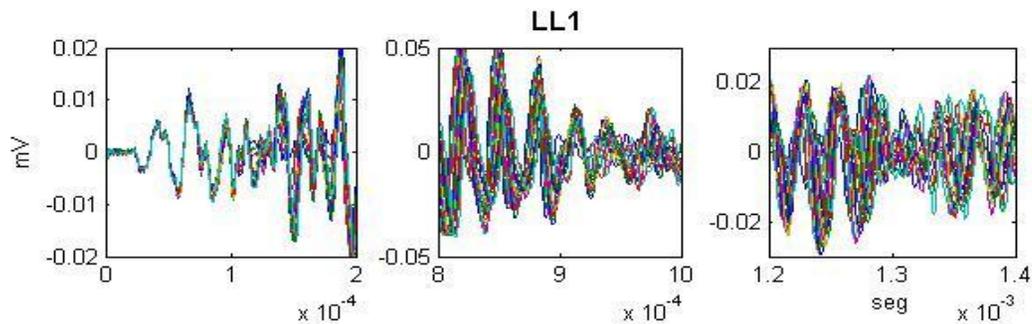


Fig.8.7. Señales pertenecientes al experimento LL1 en 3 intervalos de tiempo.

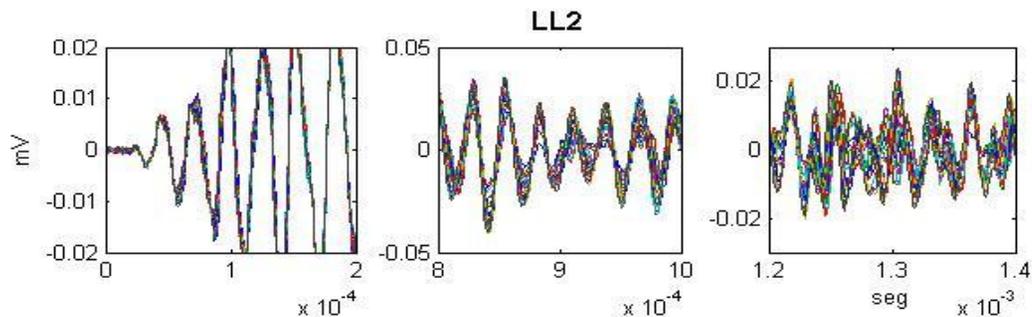


Fig.8.8. Señales pertenecientes al experimento LL2 en 3 intervalos de tiempo.

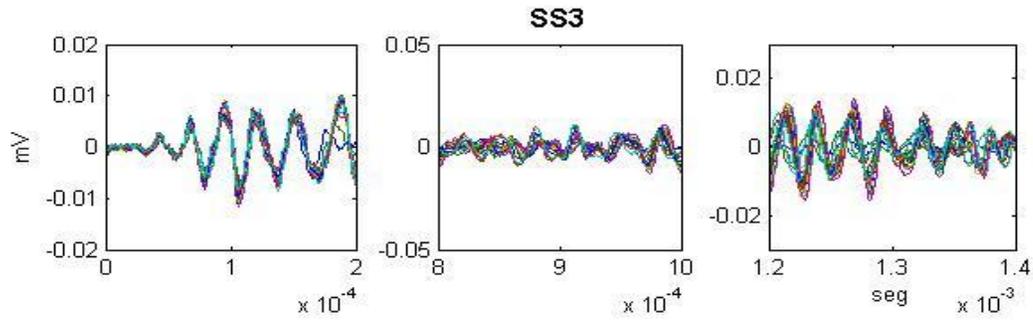


Fig.8.9. Señales pertenecientes al experimento SS3 en 3 intervalos de tiempo.

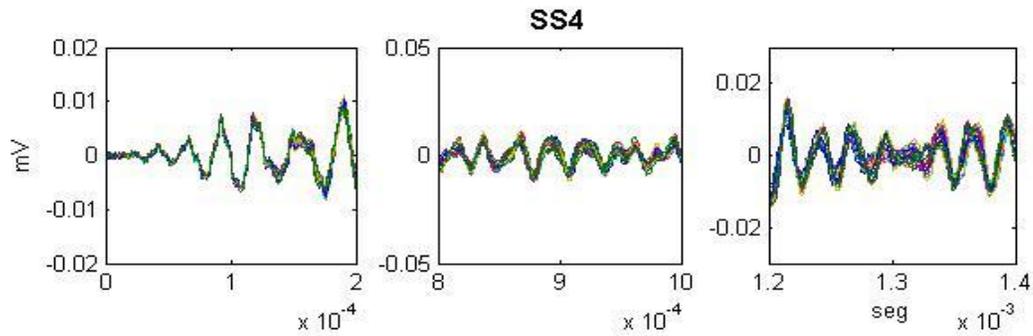


Fig.8.10. Señales pertenecientes al experimento SS4 en 3 intervalos de tiempo.

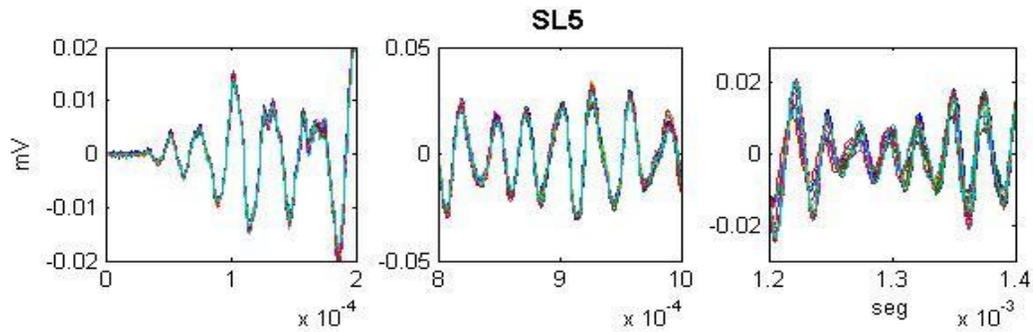


Fig.8.11. Señales pertenecientes al experimento SL5 en 3 intervalos de tiempo.

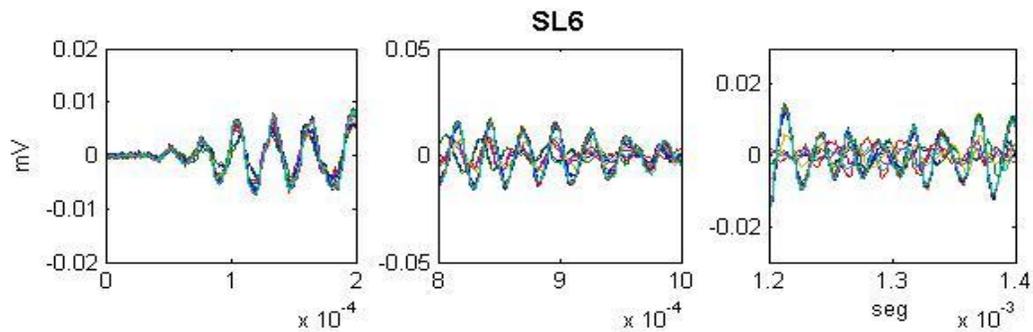


Fig.8.12. Señales pertenecientes al experimento SL6 en 3 intervalos de tiempo.

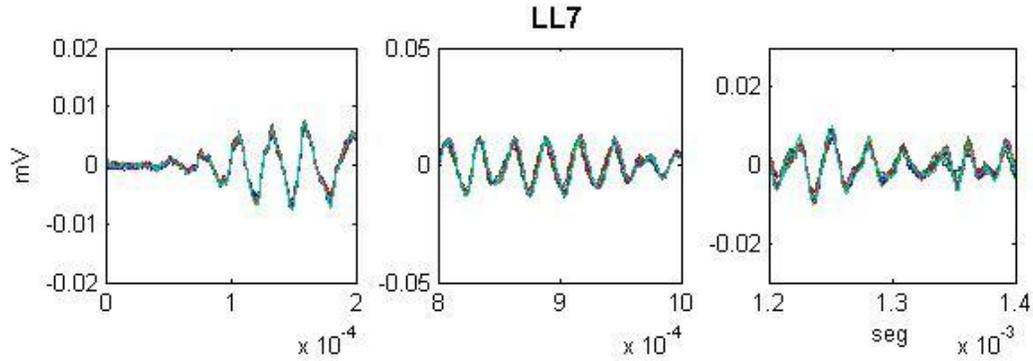


Fig.8.13. Señales pertenecientes al experimento LL7 en 3 intervalos de tiempo.

A diferencia de Ogasawara *et al.* (2006), se utilizó como señal de entrada un pulso y no una función senoidal, ello permite observar el tiempo de llegada de la señal en el otro extremo del transductor. Analizando los primeros instantes de la señal de todos los experimentos se observa que el tiempo de arribo es el mismo, por otra parte, el análisis de las señales por experimento revela que la forma de la onda se mantiene constante (Fig. 8.14).

El tiempo en que tarda en llegar la señal al otro extremo del recipiente es aproximadamente 2.6×10^{-5} segundos y la distancia que recorre es 5.45 cm, por lo tanto se obtiene que la velocidad de propagación promedio (del frasco y de la leche) es de 2096 m/s. Debido a que el transductor envía una señal cuyo espectro de frecuencias se encuentra alrededor de 50 KHz, se calcula una longitud de onda de 4.19 cm para una frecuencia de 50 KHz (Ec. 5.24).

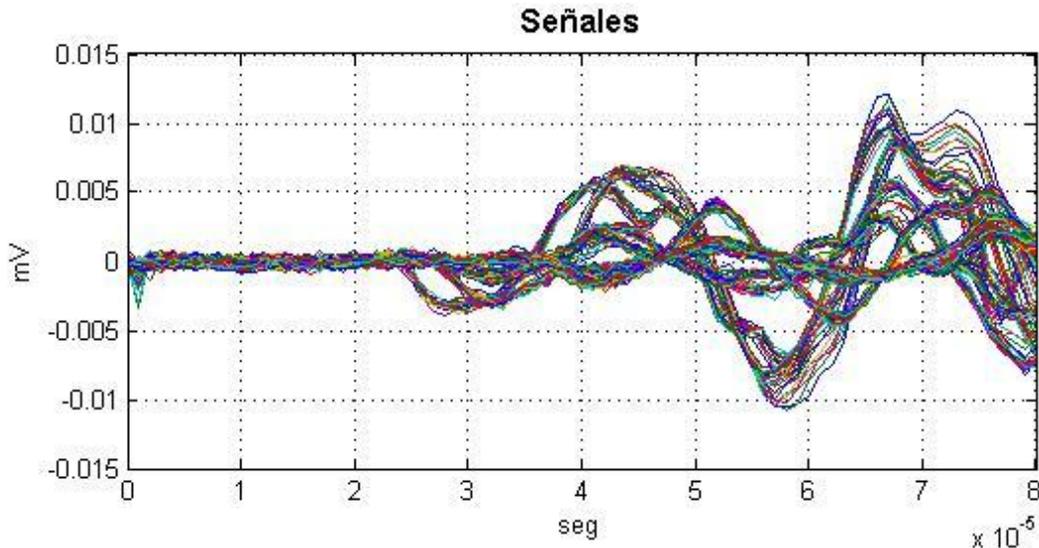


Fig.8.14. Primeros instantes de todas las señales obtenidas durante la experimentación.

En sus resultados Resa *et al* (2007) muestra una variación de la velocidad de propagación de 1.4 m/s al cabo de 30 horas de fermentación, sin embargo, la longitud del recipiente es pequeña en comparación al tiempo que tarda en llegar la onda, por ello solo se observa una variación muy pequeña en el tiempo que dura la señal emitida por el equipo.

8.2.2. ANALISIS EN LA FRECUENCIA

A diferencia de Ogasawara *et al.* (2006) se analizaron los espectros de amplitudes de las señales y no los espectros de fases, en la Figura 8.15 se muestran las transformadas de Fourier en el minuto 120 de cada experimento, es a partir de este momento que la temperatura se considera constante en el resto del experimento (Fig. 7.10). En las transformadas se observan que existen 2 rangos principales de frecuencias características, de 30 a 40 KHz y de 55 a 65 KHz. Se estudia únicamente el rango de 25 a 75 KHz debido a que el transductor solo envió una señal cuya frecuencia principal está alrededor de 50 KHz.

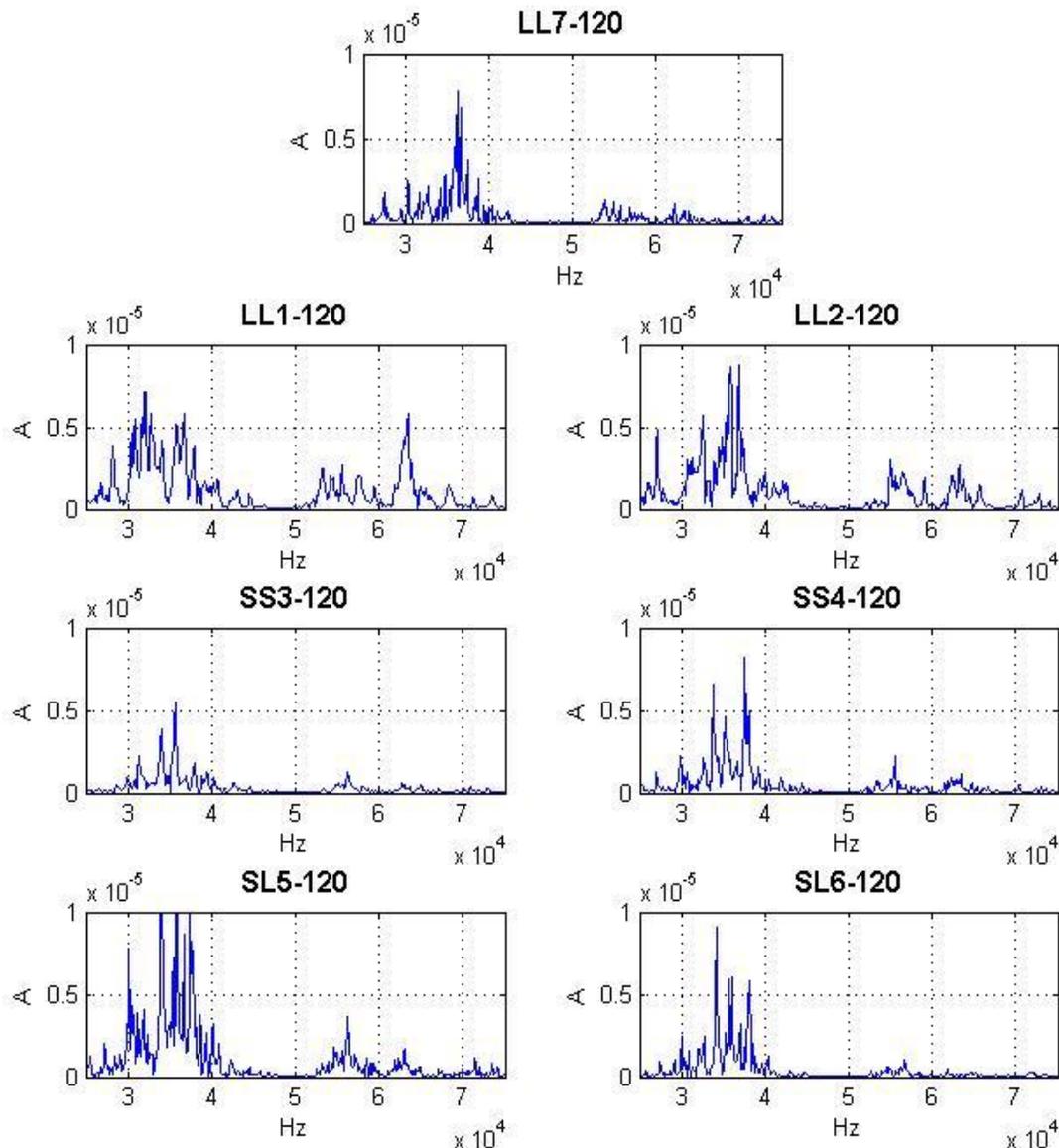


Fig.8.15. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el minuto 120 de la experimentación.

Existen ligeros cambios en las amplitudes de las frecuencias de acuerdo al experimento, en el primer rango de frecuencias (de 25 a 50 KHz), se observa en los experimentos SS3 y SS4 que la frecuencia máxima se encuentra alrededor de 37 KHz con un valor entre 6×10^{-6} y 8×10^{-6} . En los experimentos pertenecientes a LL7 y LL2 la amplitud máxima se encuentra alrededor de 37 KHz con un valor de 8×10^{-6} , mientras que en el experimento LL1 tiene un máximo de 7×10^{-5} en una frecuencia de 32 KHz. Los experimentos SL5 y SL6 tienen un máximo de 1.7×10^{-5} y 0.9×10^{-5} respectivamente en la frecuencia de 34 KHz.

En la segunda sección de frecuencias (de 50 a 75 KHz) los coeficientes parecen ser de relevancia sólo en los experimentos LL1, LL2 y SL5, con múltiples máximos relativos dentro de un rango de 55 a 65 KHz.

Los coeficientes de correlación entre las transformadas de las señales obtenidas en los diferentes experimentos en el minuto 120 de la fermentación se observan en la Tabla 8.5, el rango de frecuencias evaluado es de 25 a 75 KHz. En la tabla se observa que los experimentos LL1 y LL2 son muy similares entre sí. De igual manera SS3 con SS4 son similares. Sin embargo, en los experimentos SL5 y SL6 no se aprecia similitud e incluso SL5 tiene una mayor similitud con los experimentos SS3 y SS4 que con SL6, de hecho SL6 no presenta una similitud significativa con ningún experimento, el mismo fenómeno se observa con LL7 que solo presenta una ligera similitud con LL2. Por lo anterior, se considera que existe algún efecto además del tipo de bacteria que influye en el contenido de frecuencias de la señal.

Tabla 8.5. Coeficientes de correlación de las TF de las señales obtenidas en el minuto 120 de la fermentación de cada experimento en un rango de frecuencias de 25 a 75 KHz.

Experimento	LL1	LL2	LL7	SS3	SS4	SL5	SL6
LL1	1	0.7317	0.6307	0.6621	0.6018	0.649	0.5642
LL2	0.7317	1	0.6711	0.7092	0.6341	0.7065	0.6029
LL7	0.6307	0.6711	1	0.5248	0.5083	0.6288	0.5627
SS3	0.6621	0.7092	0.5248	1	0.7127	0.7617	0.6635
SS4	0.6018	0.6341	0.5083	0.7127	1	0.7340	0.641
SL5	0.649	0.7065	0.6288	0.7617	0.7340	1	0.6532
SL6	0.5642	0.6029	0.5627	0.6635	0.641	0.6532	1

La evolución de las transformadas de Fourier de las señales a través del tiempo de fermentación se pueden observar en las Figuras 8.16 a la 8.22. Para cada incremento de 60 minutos en el tiempo de la fermentación, la línea base de las señales se encuentra espaciada 1×10^{-5} unidades.

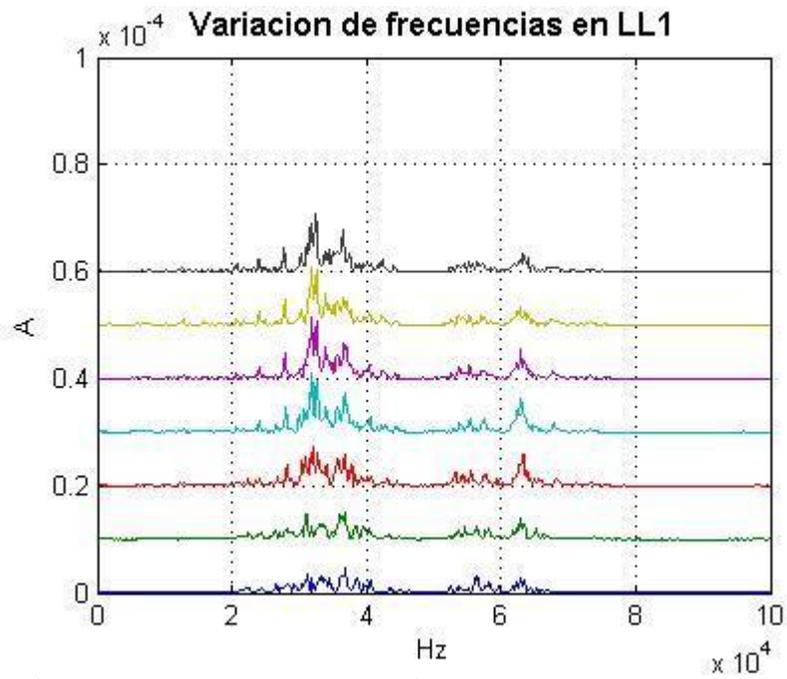


Fig.8.16. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento LL1

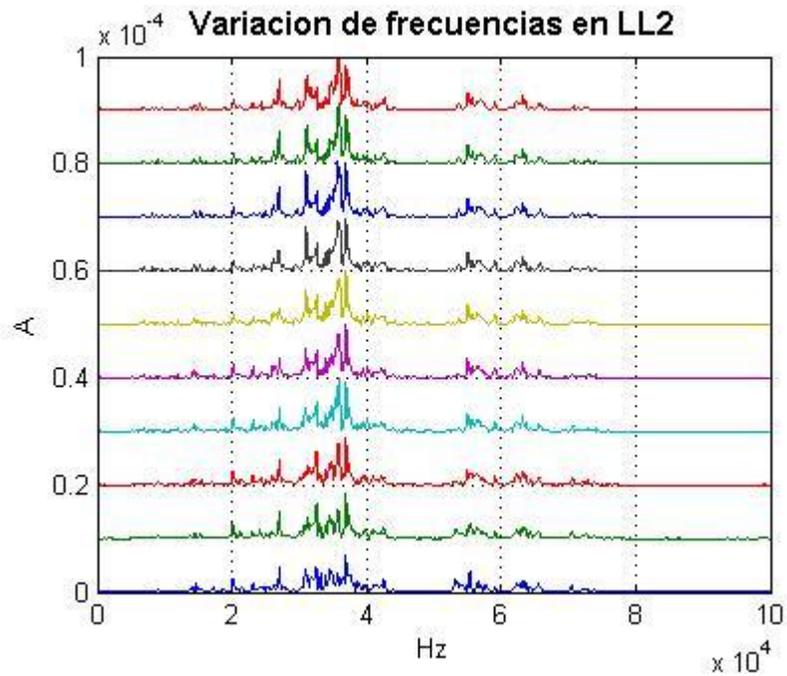


Fig.8.17. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento LL2

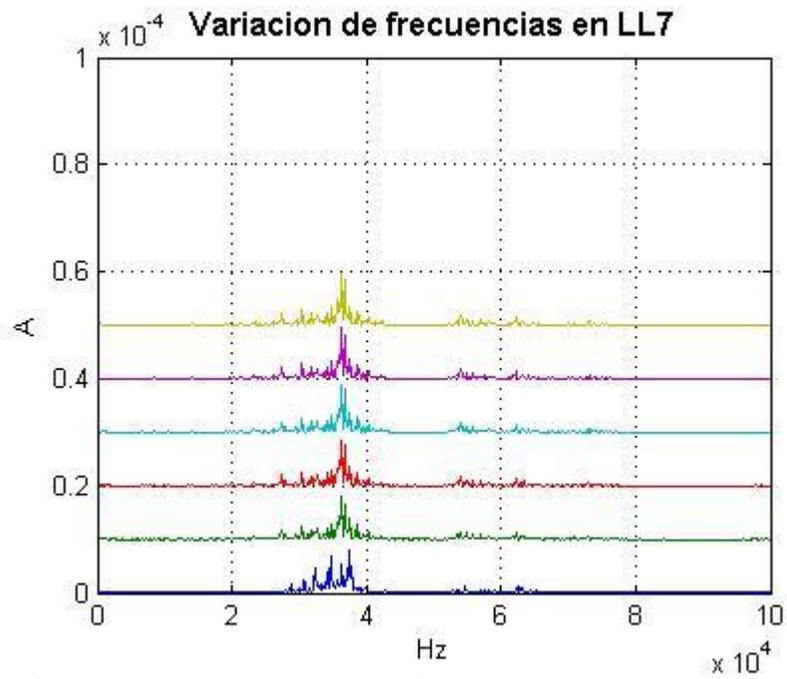


Fig.8.18. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento LL7

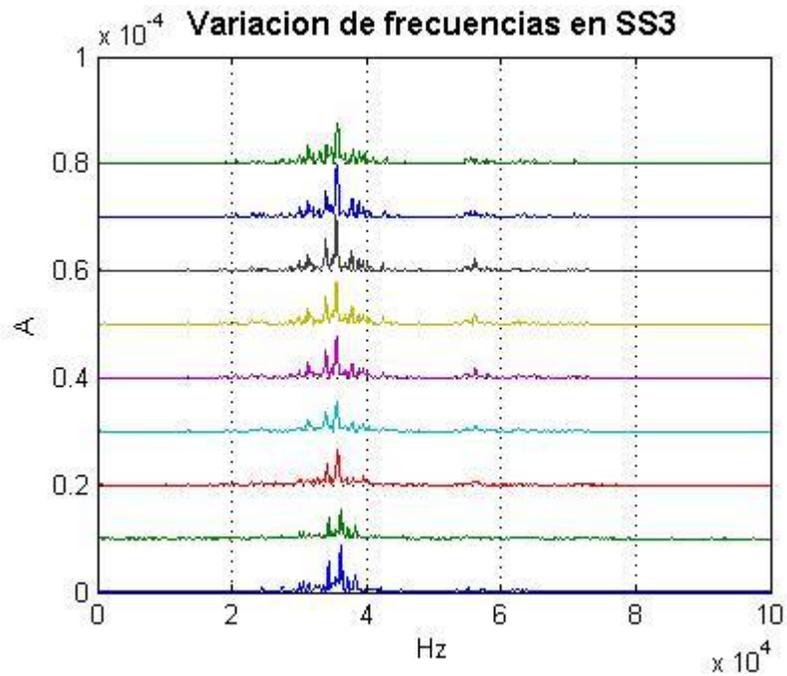


Fig.8.19. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento SS3

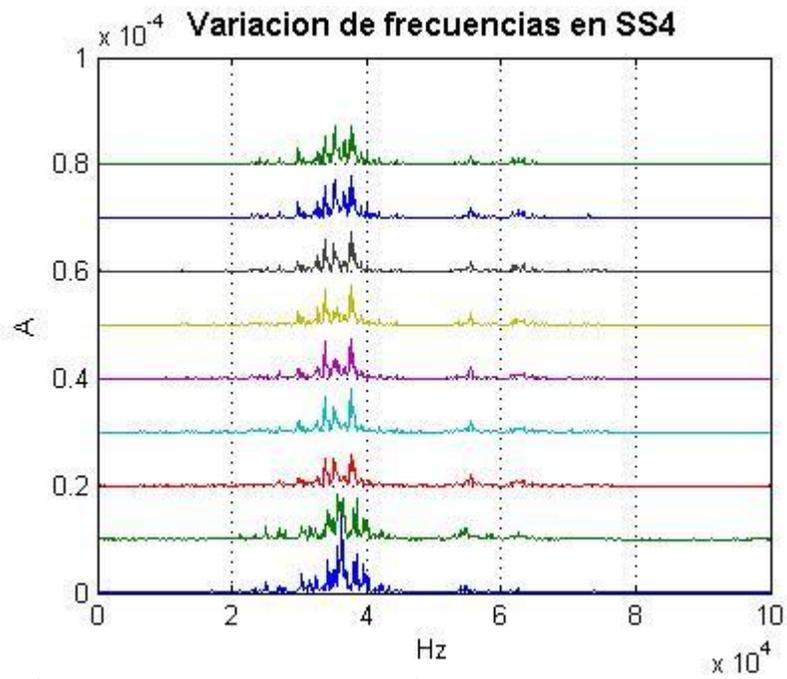


Fig.8.20. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento SS4

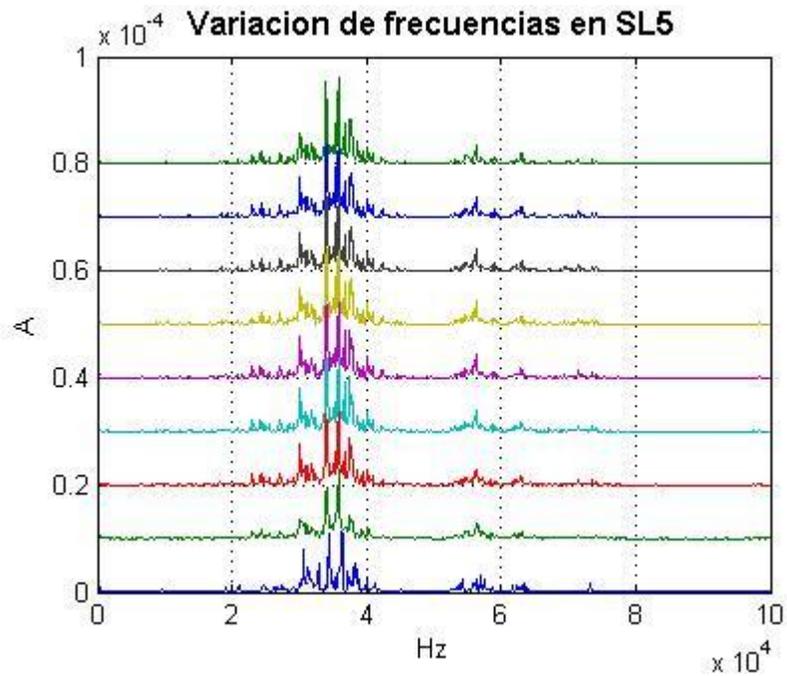


Fig.8.21. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento SL5

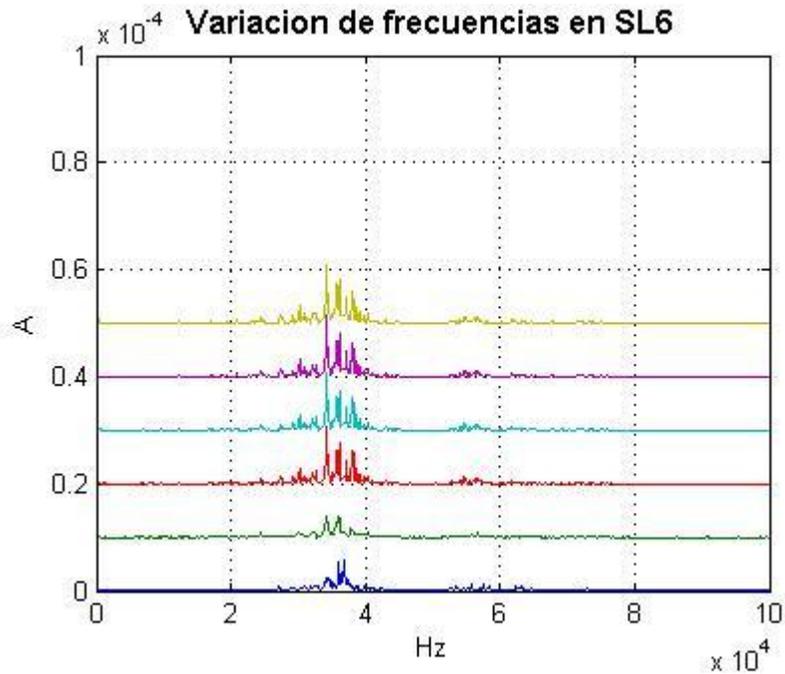


Fig.8.22. Transformada de Fourier de las señales obtenidas en el experimento SL6

Las graficas anteriores muestran la evolución de las transformadas de las señales durante la fermentación. En ellas se observa que existen muy pocos cambios en el contenido de frecuencias de las señales a través del tiempo de la fermentación, la mayor variabilidad se observa al inicio de la fermentación que es cuando se existen cambios de temperatura significativos ($> 2^{\circ}\text{C}$). Las graficas pertenecientes al experimento LL1 muestran cambios en la amplitud de las frecuencias que componen la señal e incluso un ligero cambio en el contenido de frecuencias al inicio de la fermentación.

La Figura 8.23 muestra la evolución, a través del tiempo de la fermentación, de los coeficientes de correlación de las transformadas de Fourier de cada señal con respecto a la transformada de Fourier de la señal obtenida en el minuto 120. En ella se observa que la variación de los coeficientes de correlación del experimento LL1 presenta una variabilidad mayor que en el resto de los experimentos, dicho cambio se atribuye a la temperatura que afecta el contenido de frecuencias y amplitud de las señales obtenidas en el experimento. En el experimento SL6 no se disponen datos del comportamiento de temperatura, por ello es difícil la interpretación en cuanto al comportamiento inicial del experimento SL6.

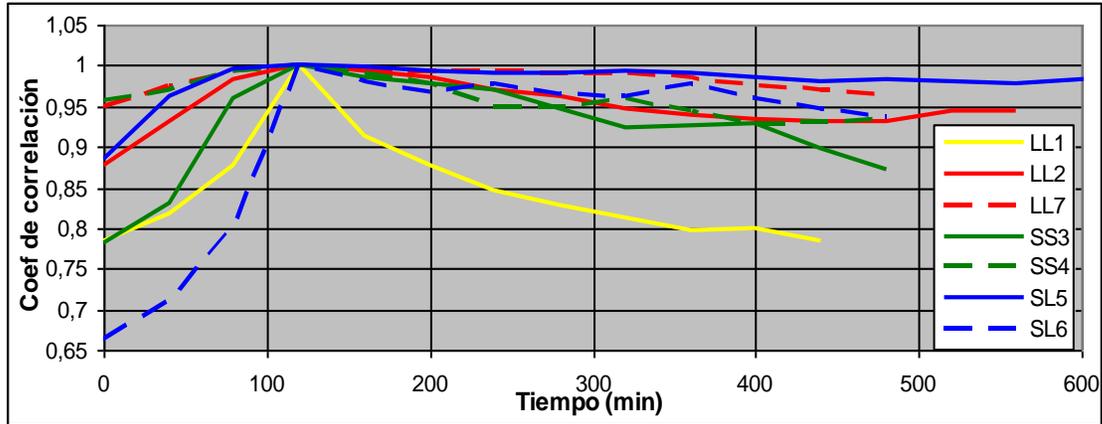


Fig.8.23. Coeficientes de correlación de las TF de las señales obtenidas con respecto a la TF de la señal obtenida en el minuto 120 por experimento

8.2.3. ANÁLISIS WAVELET

Los estudios anteriormente realizados se han enfocado al análisis en tiempo (Resa *et al.*, 2007), o en frecuencia (Ogasawara *et al.*, 2006), mientras que técnicas de análisis tiempo-frecuencia se han enfocado en otras variables (Ibarra *et al.*, 2008). La información de la velocidad de propagación de la onda se encuentra en el dominio del tiempo, mientras que el dominio de la frecuencia ofrece información del medio al encontrarse modos característicos de los sistemas, en el presente análisis se hace uso de la transformada wavelet continua que permite obtener información de ambos dominios. En la Figura 8.24 se observan las transformadas wavelet de señales correspondientes al minuto 120 de la fermentación. Al igual que en las transformadas de Fourier, se observa que existen altos valores en los coeficientes asociados a una frecuencia comprendida entre 30 y 40 KHz, pero en estas gráficas se observa como está distribuida la energía de la señal a través del tiempo.

Los dos grupos de señales obtenidas del cultivo de *S. thermophilus* (experimentos SS3 y SS4) son muy similares entre sí, y lo mismo se observa en las primeras señales obtenidas del cultivo de *L. acidophilus* (experimentos LL1 y LL2). Sin embargo, las señales pertenecientes al experimento SL6 tienen más en común con las señales de los experimentos SS3 y SS4 que con las señales del experimento SL5. Por otra parte las señales del experimento LL7 son muy diferentes de las señales de los experimentos LL1 y LL2. Por lo anterior, y considerando que se tiene un solo tipo de frasco y la presión está controlada, se deduce que existe otro factor que determina la forma de la señal además del tipo de bacteria presente, dicho factor puede estar relacionado a la superficie del recipiente o algún ligero cambio en su orientación que afectaría el área de contacto para la transmisión del pulso.

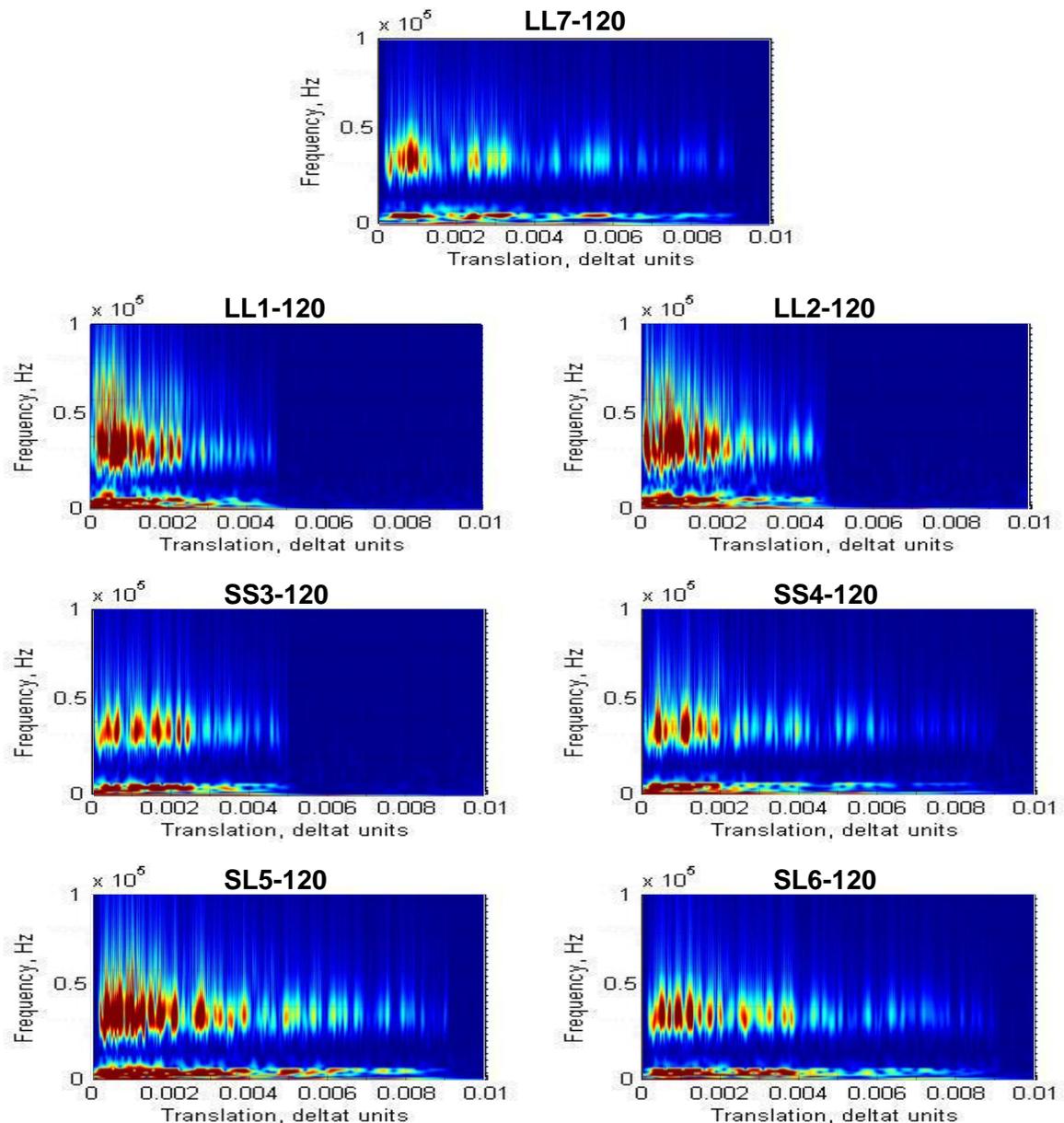


Fig.8.24. Transformada wavelet continua de las señales obtenidas en el minuto 120 en los diferentes experimentos realizados.

La evolución de las transformadas wavelet de las señales por cada experimento se observan en las Figuras 8.25 a 8.31, en ellas se observa una variación en la duración de la frecuencia correspondiente a 35 KHz. Al analizarlas por experimento, se observa que la frecuencia alrededor de 35 KHz disminuye su atenuación de manera importante durante los primeros 100 minutos del tiempo de fermentación, las señales que incluso varían su contenido de frecuencias son las pertenecientes al experimento LL1 donde se observa un aumento en el valor de los coeficientes pertenecientes a la frecuencia de 65 KHz en un tiempo de entre 8×10^{-4} y 12×10^{-4} segundos del tiempo de la señal.

El fenómeno de la atenuación de la señal es más notorio en los experimentos SS3, SS4, SL5 y SL6, mientras que las transformadas de las señales pertenecientes al experimento

LL7 no muestran cambios significativos a través del tiempo de fermentación, e incluso se observan más atenuadas que en el resto de los experimentos.

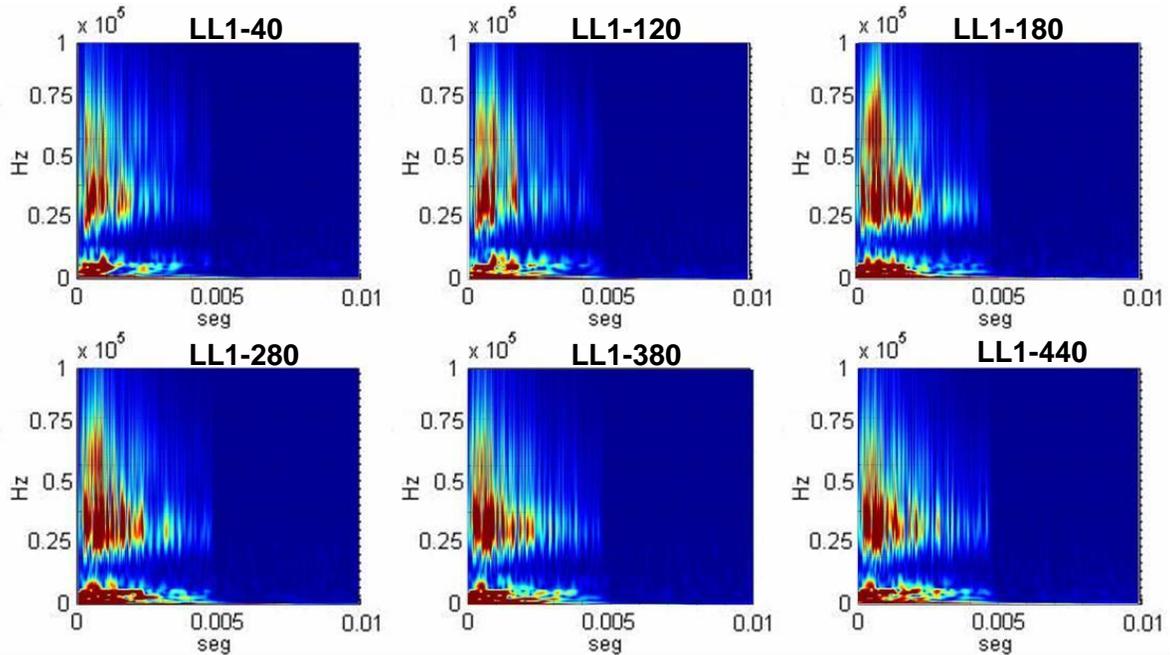


Fig. 8.25. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 40, 120, 180, 280, 380 y 440 del experimento LL1.

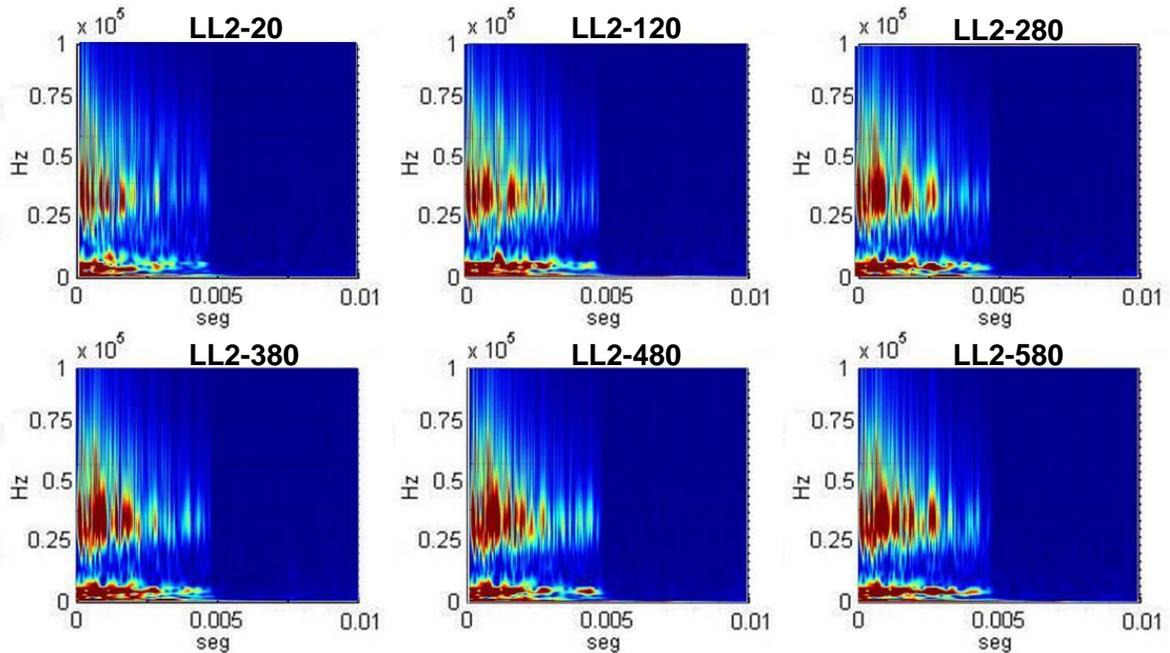


Fig. 8.26. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 20, 120, 280, 380, 480 y 580 del experimento LL2.

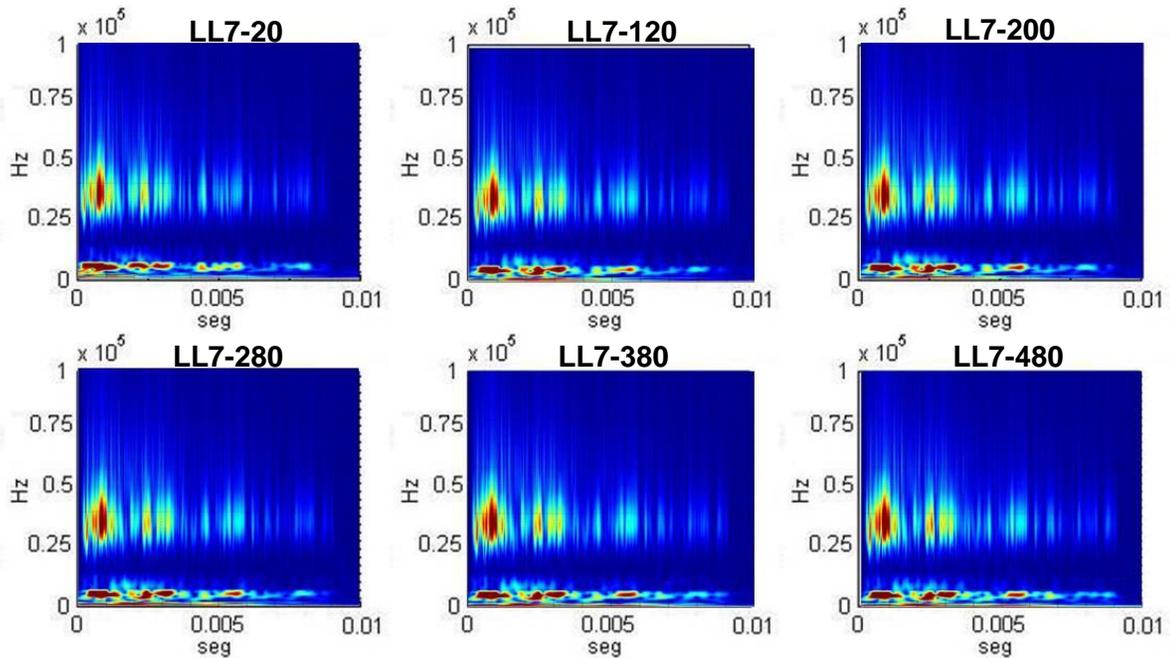


Fig. 8.27. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 20, 120, 200, 280, 380 y 480 del experimento LL7.

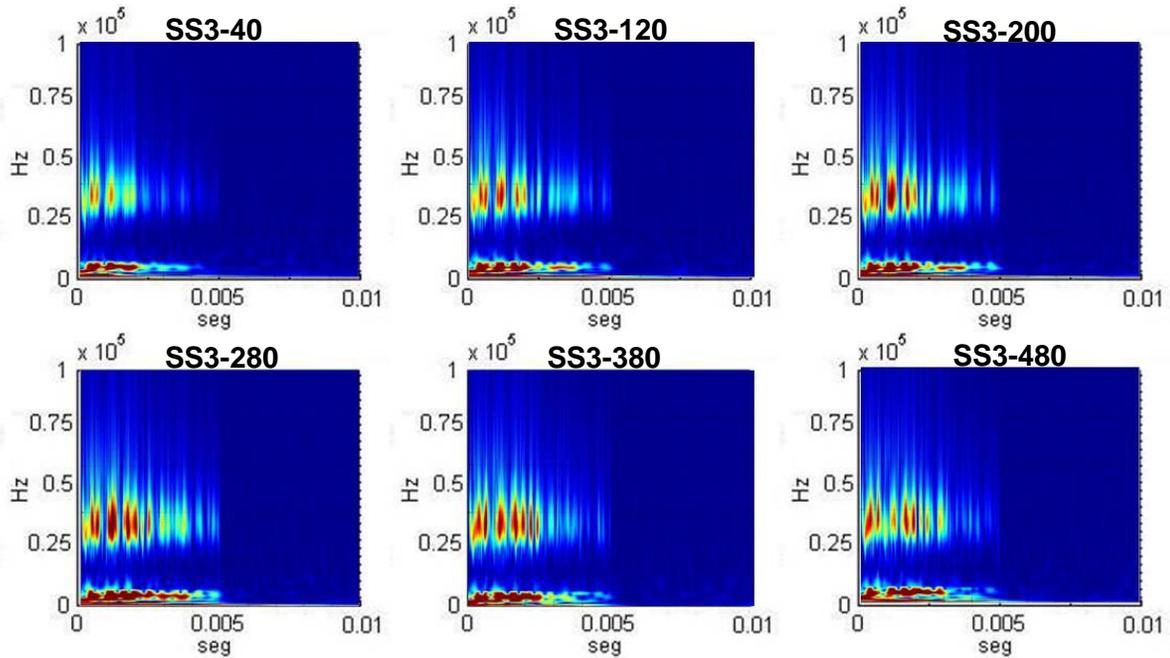


Fig. 8.28. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 40, 120, 200, 280, 380 y 480 del experimento SS3.

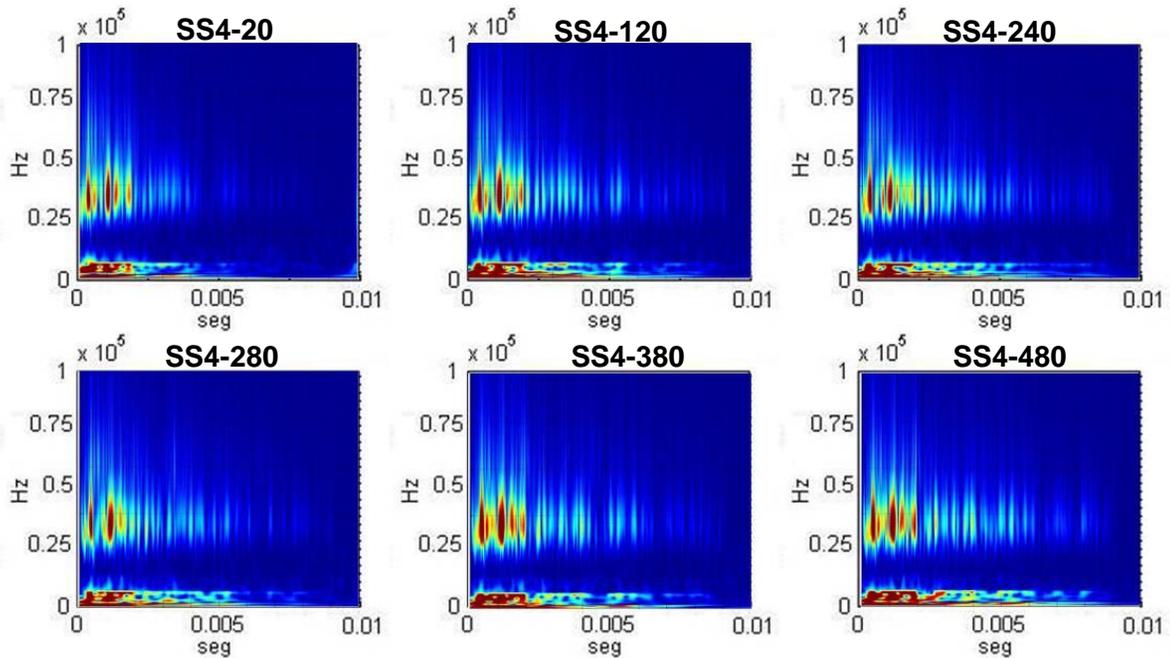


Fig. 8.29. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 20, 120, 240, 280, 380 y 480 del experimento SS4.

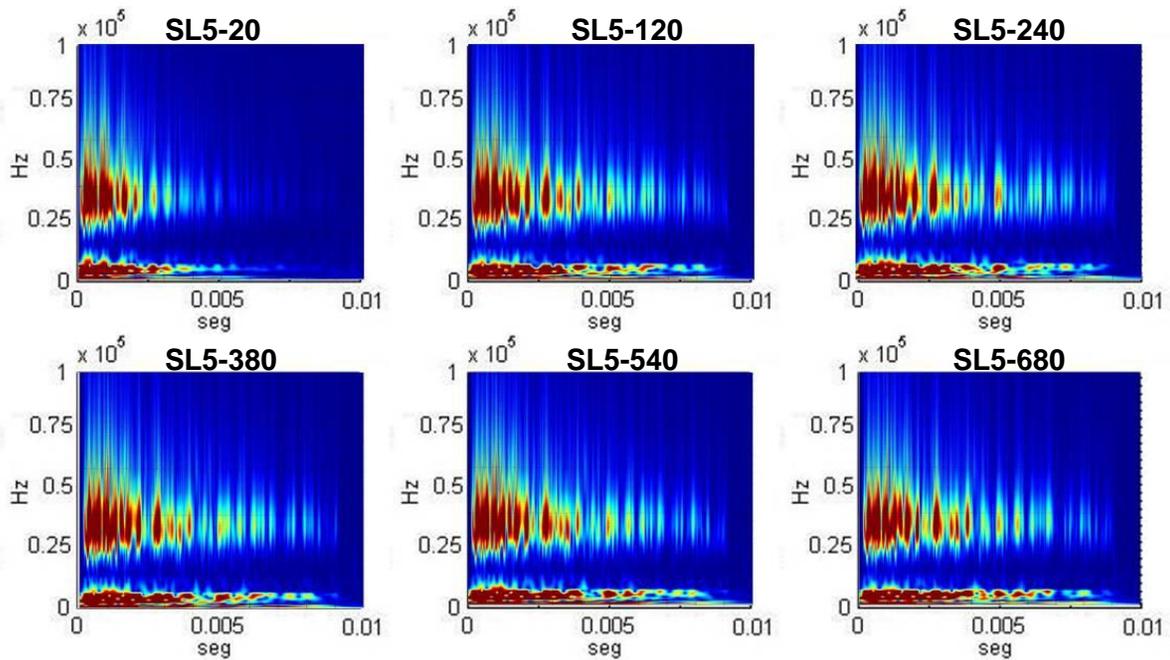


Fig. 8.30. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 20, 120, 240, 380, 540 y 680 del experimento SL5.

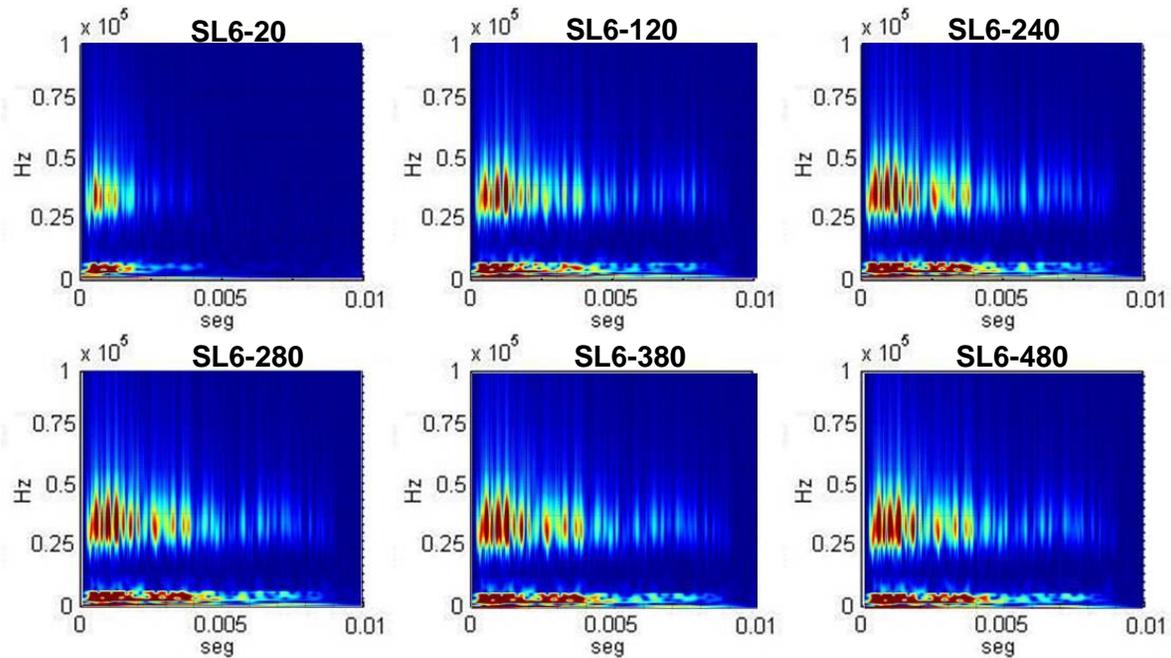


Fig. 8.31. Transformada wavelet de las señales obtenidas en los minutos 20, 120, 240, 280, 380 y 480 del experimento SL6.

Al realizar un acercamiento en las imágenes de las transformadas obtenidas, se observa el tiempo en que tarda en llegar una frecuencia específica, y con valores de la distancia y el tiempo de arribo se puede calcular la velocidad de propagación. La Figura 8.32 muestra un acercamiento en la imagen de la transformada wavelet de la señal perteneciente al experimento LL2 en el minuto 120, en dicha imagen se puede observar el tiempo de arribo, el cual es alrededor de 3×10^{-5} seg en una frecuencia de 37 KHz. Dicha información es similar a la obtenida a través de la Figura 8.14, con la ventaja de que en la Figura 8.32 se logra identificar un valor característico en la frecuencia.

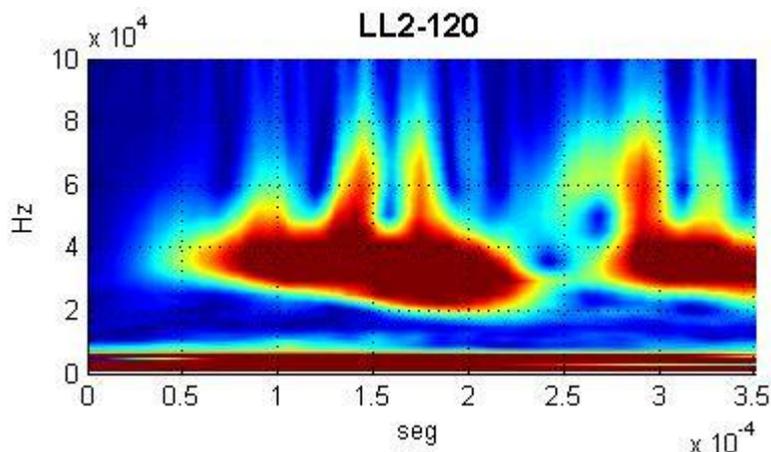


Fig. 8.32. Acercamiento de la transformada wavelet de la señal obtenida en el minuto 120 del experimento LL2.

9. CONCLUSIONES

Se monitoreó el crecimiento de *S. thermophilus* y *L. acidophilus* mediante la evaluación de propiedades físicas y químicas del medio, tales como pH, UFC y propagación de onda característica, los resultados muestran un comportamiento similar tanto en las curvas de pH como en las de UFC. El análisis de la onda ultrasónica muestra que existen cambios en su propagación durante la fermentación, estos cambios se observan en la transformada wavelet y en el análisis en el tiempo de las señales. En la transformada de Fourier no es posible identificar dichos cambios. A pesar de los resultados de los análisis anteriores, no es posible diferenciar de entre la presencia de *L. acidophilus* y *S. thermophilus*.

La variación en los coeficientes de la transformada wavelet, en una frecuencia alrededor de 35 KHz a través del tiempo de la señal, muestra que disminuye la atenuación de la señal durante el tiempo de fermentación y es congruente con la disminución del pH. Los cambios en la atenuación de la señal se atribuyen a la variación de metabolitos en la leche procedentes de la fermentación. La producción de exopolisacáridos afecta la reología de la leche provocando que aumente la viscosidad del medio disminuyendo la atenuación y aumentando la velocidad de propagación de la onda. Si no existe variación de temperatura, la señal ultrasónica es afectada principalmente por cambios de la viscosidad del medio provocado por la fermentación de la leche.

Debido a las características del medio, los transductores *de banda angosta* de 50 KHz permiten estudiar longitudes de onda alrededor de 4.185 cm (la longitud del frasco es de 5.45 cm), por lo que los cambios observados están relacionados principalmente a cambios en la densidad y viscosidad del medio. Se considera que la longitud de onda mínima es demasiado grande para observar cambios microbiológicos en el medio.

A diferencia del análisis de la velocidad de propagación propuesto por Resa *et al.* (2007) y el análisis del cambio de fase de una señal senoidal propuesto por Ogasawara *et al.* (2006), en el presente estudio es posible identificar cambios en la atenuación de la señal a través de la transformada wavelet de las señales, así como el contenido de frecuencias de la señal recibida que ofrece información de los modos característicos del sistema.

BIBLIOGRAFÍA

- AEND. (2006). Ensayos No Destructivos, Ultrasonidos. Nivel II. Ed. Fundación Confemetal. 1a edición.
- Bakhtazad A., Palazoglu A. y Romagnoli J. (1999). Process Data De-noising Using Wavelet Transform. *Intelligent Data Analysis*. Vol 267. pag 285.
- Bakshi B. y Stephanopoulos G. (1994). Representation of Process Trends-IV. Induction of realtime patterns from operating data for diagnosis and supervisory control. *Computers and Chemical Engineering*. Vol 18. Issue 4. pag 303-336.
- Bergey. (1957). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Edited by Breed, R.S., Murray, E.G.D. y Smith, N.R. Williams y Wilkins. Baltimore. 7a edición.
- Bergey. (1974). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Edited by Buchanan, R.E. y Gibbons N. Williams y Wilkins. Baltimore. 8a edición.
- Bergey. (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe M. and Holt J. Williams and Wilkins. Baltimore. Vol 2.
- Bermúdez M., Faura F., Martínez G. y Ojados J. (1992). Prácticas de Ciencia de Materiales: Fundamento y Desarrollo. Secretariado de Publicaciones. Universidad de Murcia. 3a edición.
- Berovic M. (1999). Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol 64 . pag 552-557.
- Campbell-Platt G. (1987). In Fermented Foods of the World. Butterworth, London.
- Cheraiti N., Guezenc S. y Salmon J. (2005). Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 71. pag 255-260.
- Coakley W., Hawkes J., Sobanski M., Cousins C. y Spengler J. (2000). Analytical scale ultrasonic standing wave manipulation of cells and microparticles. *Ultrasonics*. Vol 38. Issue 1-8. pag 638-641.
- Cram L. S. (2002). Flow cytometry, an overview. *Methods in Cell Science*. Vol 24. pag 1-9.
- CULTIMED (2003). Manual básico de microbiología. Ed. Panreac química S. A.
- Dave R. y Shah N. (1997b). Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. *International Dairy Journal*. Vol 7. pag 707-715.
- Dave R. y Shah N. (1996). Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol 79. pag 1529-1536.
- Dave R. y Shah N. (1997a). Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*. Vol 7. pag 31-41.
- Davis J., Ashton T. y McCaskill M. (1971). Enumeration and viability of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in yogurt. *Dairy Industries*. Vol 36. pag 569-573.
- De Brabandere A. y De Baerdemaeker J. (1999). Effects of process conditions on the pH development during yogurt fermentation. *Journal of Food Engineering*. Vol 41. pag 221-227.
- Drewek, Z. y Czarnocka-Roczniakowa, B. (1986). Microbiological processes in folacin synthesis in kefir. *Acta Alimentaria Polonica*. Department of Food Engineering and Biotechnology, Agricultural and Technical University, Olsztyn, Poland. Vol 12. Issue 1. pag 39-45.
- Duque L. y Rubio H. (2006). Semiología Médica Integral. Ed. Universidad de Antioquia. 1a edición.
- Ellis D., Broadhurst D., Kell D., Rowland J. y Goodacre R. (2002). Rapid and quantitative detection of the microbial spoilage of meat using FT-IR spectroscopy and machine learning. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 68. pag 2822-2828.
- Errampalli D., Okamura H., Lee H., Trevors J. y Van Elsas J. (1998). Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of phenanthrene-mineralizing *Pseudomonas* sp. UG14Gr in cresosote-contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol 26. pag 181-191.
- Erzinkyan L., Akopova A., Tsibul'skaya M. y Pomortseva N. (1987). Vitamin-synthesizing activity of lactic acid bacteria in yoghurt. *Biological Journal of Armenia*. Vol 37. Issue 10. pag 847-850.
- Escamilla-Hurtado y Olguin-Lora. (1997). Procedimiento de elaboración de un alimento fermentado de maíz y producto resultante. Patent No. 187205. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. México.
- Escamilla-Hurtado, Valdés-Martínez, Soriano-Santos y Tomasini-Campocoso. (2000). Effect of some nutritional and environmental parameters on the production of diacetyl and on starch consumption by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in submerged cultures. *Journal of Applied Microbiology*. Vol 88. pag 142-153.
- Fanatsu T., Taniyama T., Tajima T., Tadakuma H. y Namiki H. (2002). Rapid and sensitive detection method of a bacterium by using GFP reporter phage. *Microbiology and Immunology*. Vol 46. Issue 6. pag 365-369.
- FDA. (1996). Yogurt. 21 CFR 131.200, Code of Federal Regulations. U.S. Dept. of Health and Human Services. Washington, DC.

- Formisano M., Coppola S., Percuoco G., Percuoco S., Zoina A. y Capriglione I. (1974). Evaluation of the lipolysis in yoghurt. *Nuovi annali d'igiene e microbiologia*. Vol 25. Issue 3. pag 214-222.
- Gavin M. (1968). In La Lyophilisation des Cultures de Yoghourt. These No. 4227. l'Ecole Polytechnique Fédérale. Zurich.
- Gilliland S. y Speck M. (1977). Instability of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt. *Journal of Dairy Science*. Vol 60. pag 1394-1398.
- Hamann W. y Marth E. (1983). Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. *Journal of Food Protection*. Vol 47. Issue 10. pag 781-786.
- Hansen R. (1985). Bifidobacteria have come to stay. *North European Dairy Journal*. Vol 3. pag 1-6.
- Hardy Diagnostics. (2000). *Streptococcus: Información Técnica*. Holanda.
- Heertje I., Visser J. y Smits P. (1985). Structure formation in acid milk gels. *Food Microstructure*. Vol 4. pag 267-277.
- Hobson N., Tothill I. y Turner A. (1996). Review Article: Microbial Detection. *Biosensors y Bioelectronics*. Vol 11. Issue 5. pag 455-477.
- Hughes D. y Hoover D. (1991). Bifidobacteria: Their potential for use in American dairy products. *Food Technology*. Vol 45. Issue 4. pag 74-83.
- Hull R., Roberts A. y Mayes J. (1984). Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt. *The Australian Journal of Dairy Technology*. Vol 39. Issue 4. pag 164-166.
- Ibarra-Junquera V., Murguía J., Escalante-Minakata P. y Rosu H. (2008). Application of multifractal wavelet analysis to spontaneous fermentation processes. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. Vol 387. Issue 12. pag 2802-2808.
- IDF (1995). Detection and enumeration of *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Federation*. Bulletin No. 306. Belgium.
- Ishibashi N. y Shimamura S. (1993). Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technology*. Vol 47. Issue 6. pag 126, 129-134.
- Iyer R., Tomar S., Maheswari T. y Singh R. (2010). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. Vol 20. pag 133-141.
- Jae-Hyung A., Yoo-Jeong K., Taesung K., Hong-Gyu S., ChulHee K. y Jong-Ok K. (2009). Quantitative improvement of 16S rDNA DGGE analysis for soil bacterial community using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*. Vol 78. Issue 2. pag 216-222.
- Jiang T., Chen B., He X. y Stuart P. (2003). Application of steady-state detection method based on wavelet transform. *Computers and Chemical Engineering*. Vol 27. Issue 4. pag 569-578.
- Kandler O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol 49. pag 209-224.
- Kaneko T., Suzuki H. y Takahashi T. (1987). The effects of metal ions on diacetyl production by *Streptococcus lactis* subsp *diacetylactis*. *Agricultural and Biological Chemistry*. Vol 51. pag 2315-2320.
- Kim E., Lee K., Park Y. y Kwak H. (1993). The study of lactic acid bacteria in yogurt during delivery and storage. *Korean Journal of Dairy Science*. Vol 14. Issue 3. pag 260-268.
- Kramer M. y Lim D. (2004). A rapid and automated fiber opticbased biosensor assay for the detection of *Salmonella* in spent irrigation water used in the sprouting of sprout seeds. *Journal of Food Protection*. Vol 67. pag 46-52.
- Kukec A., Berovic M., Celan S., Wondra M. (2002). The role of on-line redox potential measurement in Sauvignon blanc fermentation. *Food Technology and Biotechnology*. Vol 40. pag 49-55.
- Kurmann J., Rasic J. y Kroger M. (1992). In *Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Kwong S., Randers L. y Govin R. (1992). On-line assessment of metabolic activities based on culture redox potential and dissolved oxygen profiles during aerobic fermentation. *Biotechnology Progress*. Vol 8. pag 576-579.
- Law B. y Kolstad J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. *Antonie van Leewenhoek*. Vol 49. pag 225-245.
- Lawrence R., Thomas T. y Terzaghi B. (1976). Reviews in the progress of dairy science: cheese staters. *Journal of Dairy Research*. Vol 43. pag 141-193.
- Lima, Kruger, Behrens, Destro, Landgraf y de Melo Franco. (2009). Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *LWT-Food Science and Technology*. Vol 42. Issue 2. pag 491-495.
- Lin Z. y Chen J. (1996). Advances in time-frequency analysis of biomedical signals. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. Vol 24. Issue 1. pag 1-72.
- López L. (2010). *Temas De Física*. Ed. Club Universitario. 1a edición.
- Lourens-Hattingh A. y Viljoen B. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. Vol 11. Issue 1-2. pag 1-17.

- Lund, Baird-Parker y Warwick. (2000). The microbiological safety and quality of food. *Aspen Publishers*. EUA. Vol 2. pag 547.
- Masuzawa N., Kimura A. y Ohdaira E. (2003). Ultrasonic monitoring of the progress of lactic acid fermentation. *Japanese Journal of Applied Physics*. Vol 42. pag 2963.
- McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*. Vol 6. pag 293-299.
- Metchnikoff E. (1910). In *The Prolongation of Life*. Edited by C. Mitchell. Revised Edition of 1907. Heineman, London.
- Nannen N. y Hutkins R. (1991). Proton-translocating adenosine triphosphatase activity in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol 74. pag 747-751.
- Nebeker B., Buckner B., Hirleman E., Lathrop A. y Bhunia A. (2001). Identification and characterization of bacteria on surfaces using polarized light scattering. *Proceedings of the SPIE*. Vol 4206. pag 224-234.
- Nounou M. y Bakshi B. (1999). On-line multiscale filtering of random and gross errors without process models. *AIChE Journal*. Vol 45. Issue 5. pag 1041-1058.
- O'Sullivan M., Thornton G., O'Sullivan G. y Collins J. (1992). Probiotic bacteria: myth or reality?. *Trends in Food Science and Technology*. Vol 3. pag 309-314.
- Ogasawara H, Mizutani K, Ohbuchi T, y Nakamura T. (2006). Acoustical experiment of yogurt fermentation process. *Ultrasonics*. Vol 44, Supplement 1. pag 727-730.
- Orla-Jensen S. (1931). In *Dairy Bacteriology*. Edited by Arup P. y Churchill A. London. 2a edición.
- Owens F. (1993). *Signal Processing of Speech*. Macmillan, New York.
- Østlie, Treimo J. y Narvhus J. A. (2005). Effect of Temperature on Growth and Metabolism of Probiotic Bacteria in Milk. *International Dairy Journal*. Vol 15. Issue 10. pag 989-997.
- Paquet J., Lacroix C., Audet P. y Thibault J. (2000). Electrical conductivity as a tool for analysing fermentation processes for production of cheese starters. *International Dairy Journal*. Vol 10. Issue 5-6. pag 391-399.
- Parnell-Clunies E., Kakuda T., de Man J. y Cazzola F. (1988). Gelation profiles of yogurt as affected by heat treatment of milk. *Journal of Dairy Science*. Vol 71. Issue 3. pag 582-588.
- Pederson C. (1979). In *Microbiology of Food Fermentation*. Connecticut. 2a edición. pag 1-29.
- Perkins E. y Squirrell D. (2002). Development of instrumentation to allow the detection of microorganisms using light scattering in combination with surface plasmon resonance. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol 14. pag 853-859.
- Povey M. y McClements D. (1988). Ultrasonics in food engineering. Part I: introduction and experimental methods. *Journal of Food Engineering*. Vol 8. pag 217-245.
- Purwandari U., Shah N.P., Vasiljevic T. (2007). Effects Of Exopolysaccharide-Producing Strains Of Streptococcus Thermophilus On Technological And Rheological Properties Of Set-Type Yoghurt. *International Dairy Journal*. Vol 17. Issue 11. pag 1344-1352.
- Radke-Mitchell L. y Sandine W. (1984). Associative growth and differential enumeration of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus: A review. *Journal of Food Protection*. Vol 47. pag 245-248.
- Resa P, Bolumar T., Elvira L., Pérez G. y Montero de Espinosa F. (2007). Monitoring of lactic acid fermentation in culture broth using ultrasonic velocity. *Journal of Food Engineering*. Vol 78. Issue 3. pag 1083-1091.
- Robinson R. y Tamime A. (1990). In *Dairy Microbiology - The Microbiology of Milk Products*. Elsevier Applied Science Publishers. Edited by Robinson R. K. London. 2a edición. Vol. 2. pag 291-343.
- Ruiz M. (2010). *Manual De Anestesia Regional*. Ed. Elsevier España. 2a edición.
- Rumack C. (2006). *Ecografía Diagnóstica*. Ed. Elsevier España. 3a edición. Vol 2.
- Rybka S. (1994). The enumeration of Lactobacillus, Streptococcus and Bifidobacterium species in yogurt. B.Sc. dissertation. University of New South Wales, Sydney.
- Rybka S. y Kailasapathy K. (1995). The survival of culture bacteria in fresh and freeze-dried AB yoghurts. *The Australian Journal of Dairy Technology*. Vol 50. Issue 2. pag 51-57.
- Rybka S. y Kailasapathy K. (1996). Media for the Enumeration of Yoghurt Bacteria. *International Dairy Journal*. Vol 6. pag 839-850.
- Sandrou D. y Arvanitoyannis I. (2000). Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) to the Dairy Industry: Current status and perspectives. *Food Reviews International*. Vol 16. pag 77.
- Sayers C. y Grenfell. (1993). Ultrasonics propagation through hydrating cements. *Ultrasonics*. Vol 31. Issue 3. pag 147-153.
- Shah N. (2000). Symposium of probiotic bacteria. *Journal of Dairy Science*. Vol 4. pag 894-907.
- Shankar P. y Davies F. (1976). Associative bacterial growth in yogurt starters, initial observation on stimulatory factors. *Journal of the Society of Dairy Technology*. Vol 30. Issue1. pag 31-32.
- Sinisterra J. (1992). Application of ultrasound to biotechnology: an overview. *Ultrasonics*. Vol 3. Issue 3. pag 180-185.

- Tharmaraj N. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. *Journal of Dairy Science*. Vol 86. Issue 7. pag 2288-2296.
- Van Dijk C., Ebbenhorst-Selles T., Ruisch H., Stolle-Smits T., Schijvens E., van Deelen W. y Boeriu C. (2000). Product and redox potential analysis of Sauerkraut fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol 48. pag 132-139.
- Veal D., Deere D., Ferrari B., Piper J. y Attfield P. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*. Vol 243. pag 191-210.
- Veisseyre R. (1986). *Lactología Técnica*. Ed. Acribia. España
- Villamiel M. y de Jong M. (2000). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* and *Streptococcus thermophilus* in Trypticase® Soy Broth and total bacteria in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering*. Vol 45. Issue 3. pag 171-179.
- Vinderola y Reinheimer. (2000). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*. Vol 10. Issue 4. pag 271-275.
- Wüst E. y Rudzik L. (2003). The use of infrared spectroscopy in the dairy industry. *Journal of Molecular Structure*. Vol 661-662. pag 291-298.
- Yongni S., Yong H. y Shuijuan F. (2007). Measurement of yogurt internal quality through using Vis/NIR spectroscopy. *Food Research International*. Vol 40. Issue 7. pag 835-841.
- Zwietering M., de Wit J., Cuppers H. y Van't Riet K. (1994). Modelling of bacterial growth with shifts in temperature. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 60. pag 204-213.
- Zwietering M., Jongenburger I., Rombouts F. y Van't Riet K. (1990). Modelling of the bacterial growth curve. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 56. pag 1875-1881.