



**“Optimización del proceso productivo de una nueva levadura osmotolerante y validación del sistema de limpieza CIP en las instalaciones de la planta industrial”**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Curso: 2015/16

**Alumno: Sara García Vadillo**  
**Tutor académico: Carlos A. Blanco Fuentes**  
**Tutor empresa: José M<sup>a</sup> Giralda Sánchez**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

# ÍNDICE

<b>RESUMEN/ ABSTRACT</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1.1. Levadura de panificación.....	2
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en la industria alimentaria.....	2
1.1.2. Producción industrial de levadura.....	3
1.2. Limpieza CIP.....	4
1.2.1. Proceso de limpieza en fábrica de producción de levadura industrial.....	4
1.2.2. Control de la limpieza CIP.....	5
1.2.3. Protocolos de limpieza CIP en la planta industrial de levadura.....	6
1.2.4. Validación de limpieza CIP en la planta industrial de levadura.....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
3.1. Análisis de la levadura fresca.....	13
3.1.1. Determinación del Poder Fermentativo de la levadura fresca.....	13
3.1.2. Análisis del Poder Fermentativo en conservación.....	13
3.1.3. Determinación de la materia seca celular (g/Kg) en levadura fresca.....	13
3.2. Análisis del sistema de limpieza CIP.....	13
3.2.1. Análisis fisicoquímicos.....	13
3.2.2. Análisis microbiológicos.....	14
3.2.3. Detección de ATP mediante bioluminiscencia.....	14
3.2.4. Método de validación de limpieza CIP.....	15
3.2.5. Análisis estadístico de los resultados.....	18
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
4.1. Levadura osmotolerante de panadería.....	20
4.2. Limpieza CIP.....	21
4.2.1. Control fisicoquímico.....	21
4.2.1.1. Conductividad de la sosa durante la limpieza alcalina.....	21
4.2.1.2. Temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina.....	22
4.2.1.3. Conductividad del ácido nítrico durante la limpieza ácida.....	23
4.2.1.4. Conductividad de las aguas de enjuague y escurrido final.....	23
4.2.2. Resultados de ATP mediante bioluminiscencia.....	25
4.2.3. Resultados microbiológicos.....	26
4.2.4. Balance económico.....	26
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	28
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	29
<b>ANEXO I</b> .....	1
<b>ANEXO II</b> .....	2

## RESUMEN

Hoy en día el objetivo principal de cualquier industria alimentaria es fabricar productos seguros y de alta calidad al mínimo coste posible. Para ello, es necesario optimizar los procesos productivos aprovechando al máximo los recursos disponibles, y mejorar los procesos de limpieza garantizando la inocuidad de las instalaciones. Los objetivos del presente trabajo son optimizar el proceso productivo de una levadura osmotolerante de panadería y validar el sistema de limpieza CIP. En primer lugar, se realizaron tres pruebas de fermentación de la nueva levadura en distintas condiciones y se estudiaron diferentes parámetros esenciales para su posible comercialización. Por otro lado, fue necesario realizar una validación del sistema de limpieza CIP, ya que en los protocolos de limpieza se hicieron una serie de modificaciones con el fin de mejorar la eficacia del proceso y conseguir un ahorro económico. La conductividad de la sosa utilizada en la limpieza alcalina se bajó a 70 miliSiemens (mS) y se añadió un nuevo aditivo detergente llamado DEPTA+ con propiedades antiespumantes, mojantes y complejantes. Para la validación, se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos con el objetivo de demostrar que los parámetros del sistema de limpieza CIP son capaces de lograr el propósito establecido.

## ABSTRACT

Nowadays, the main objective of any food industry is to manufacture safe and high quality products at the lowest possible cost. With this respect, it is necessary to optimize production processes maximizing the resources that are available, and to improve cleaning processes ensuring the safety of the plants. The objectives of this work are to optimize the production process of an osmotolerant baker's yeast and validate the CIP cleaning system. First, three tests of the new yeast fermentation were carried out under different conditions and different essential parameters for their possible commercialization. On the other hand, it was necessary to perform a validation of CIP cleaning system. This was because in cleaning protocols a number of modifications were made in order to improve process efficiency and achieve cost savings. The conductivity of the soda used in alkaline cleaning was lowered to 70 milliSiemens (mS) and added a new detergent additive called DEPTA + with complex properties defoamers, and wetting agents. In order to validated, chemical and microbiological analysis were done to demonstrate that the CIP parameters cleaning system are able to achieve the stated purpose.

## 1. INTRODUCCIÓN

En cualquier proceso de fabricación la optimización de los procesos productivos es una herramienta clave para el éxito de la empresa. Permite ofrecer un precio competitivo a los clientes, mejorar los márgenes de beneficio y alcanzar unos altos estándares de calidad diferenciada.

La clave para alcanzar la mayor eficiencia es asegurar un rendimiento óptimo de la planta de producción. En el presente trabajo, se busca la optimización, la mejora y el ahorro económico en una planta de producción de levadura de panadería. Para ello, es necesario dividir el trabajo en dos partes: en la primera se realiza la optimización del proceso productivo de una nueva levadura de panadería osmotolerante y en la segunda, se realiza un seguimiento del proceso de limpieza CIP para lograr la validación después de disminuir la concentración de la solución básica de limpieza y añadir un nuevo aditivo detergente.

### 1.1. Levadura de panificación

#### 1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae* en la industria alimentaria.

Las levaduras son los microorganismos más ampliamente utilizados en la industria alimentaria debido a su importancia en muchos procesos como es la fermentación, que da lugar a una serie de productos finales de interés para el ser humano.

La levadura más utilizada en las fermentaciones industriales es la especie *Saccharomyces cerevisiae*, principalmente en la producción de bebidas alcohólicas, siendo capaz de transformar los azúcares presentes en el medio en alcohol y dióxido de carbono. En la elaboración de pan, su capacidad fermentadora aporta la textura y esponjosidad propia de las masas panarias, y contribuye a sus características organolépticas. Además de ser utilizada en fermentaciones, esta levadura puede producir biomasa microbiana. En este último caso, además de una fuente de carbono abundante como la melaza, es necesario proporcionar nitrógeno para la síntesis de proteínas, sales minerales, vitaminas y oligoelementos.

En las pruebas realizadas en el presente trabajo se ha empleado una cepa de *S.cerevisiae*, que se quiere utilizar en la fermentación de masas azucaradas. Actualmente las cepas industriales que se emplean en panificación se han desarrollado mediante técnicas de selección, para conseguir una mejor adaptación a los sistemas de cultivo y tipos de proceso.

*Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo, sensible a la represión catabólica de la glucosa, que puede seguir tres vías metabólicas diferentes: oxidación de la glucosa, reducción de la glucosa y oxidación del etanol. Normalmente, si se presenta una concentración de glucosa elevada en presencia de oxígeno, la levadura metaboliza la glucosa produciendo etanol al igual que en condiciones de anaerobiosis. Sin embargo, debido al efecto Pasteur, si se suministra suficiente oxígeno y una cantidad de glucosa limitada, la levadura crece sin generar alcohol obteniendo una producción celular y de dióxido de carbono por gramo de glucosa consumida mayor que en la fermentación. El metabolismo respiratorio de la glucosa produce mayor cantidad de energía que el fermentativo, y en consecuencia se produce un mayor rendimiento de la levadura, entendiéndose como rendimiento la cantidad de células de levadura en relación con la cantidad de sustrato azucarado consumido (Dickinson & Schweizer, 2004).

### **1.1.2. Producción industrial de levadura de panificación**

La producción industrial de levadura cuenta con dos etapas claramente diferenciadas, posteriores al aislamiento de la cepa. La primera etapa se denomina “producción de levadura madre”, en ella se realiza la propagación de la levadura para sembrar los fermentadores finales. Se trata de una fermentación de tipo “Set-batch”, en la que todos los nutrientes se añaden al principio y se esterilizan antes de la siembra de levadura. Este tipo de fermentación comienza con la inoculación de la levadura seleccionada en un pequeño fermentador llamado “Minox” en condiciones anaerobias. Posteriormente, se transfiere a un fermentador de mayor tamaño.

En la segunda etapa, denominada “propagación industrial de levadura comercial”, se consigue la multiplicación de la levadura en masa confiriéndole unas características adecuadas a las exigencias del cliente. En esta etapa los nutrientes necesarios para la levadura se van agregando de forma gradual para que se consuman inmediatamente y evitar su acumulación en el medio, este tipo de fermentación se denomina “Fed-batch” (Pérez-Torrado et al., 2015). A diferencia de la primera etapa, la “propagación industrial de levadura” ocurre en condiciones aerobias, es decir, se va añadiendo oxígeno al fermentador de forma continua en función de las necesidades de la levadura. Durante esta fase aerobia, la aptitud respiratoria es mayor, la glucosa se metaboliza oxidativamente, y el etanol residual, generado a partir de esta vía metabólica, es utilizado por la levadura produciendo CO<sub>2</sub> y biomasa celular. Esta generación comercial se termina obligatoriamente con una fase de maduración, con el objetivo de garantizar la estabilidad de la levadura. Una vez finalizada la propagación

de la levadura comercial, se realiza la separación de ésta del medio de fermentación mediante máquinas centrífugas. La crema de levadura pasa a una fase de deshidratación, donde se produce la extracción de parte del agua contenida en las células. Posteriormente, dependiendo del producto final que se quiere obtener, se puede distribuir en camiones cisterna isoterms como levadura líquida o se empaqueta como levadura prensada.

El modo de producción de levadura comercial varía según el tipo levadura que se quiere obtener, debido a que tienen distintas exigencias nutritivas que satisfacen mediante la adición de melaza de caña o de remolacha como fuente de carbono; amoníaco como fuente de nitrógeno; minerales; oligoelementos (K, Na, Mg, S, Fe, Cu y Zn) y vitaminas (seis vitaminas del grupo B), agua y aire. Cada fermentación tiene su propia “receta”. Se entiende por “receta” la cantidad de materia prima utilizada en el proceso para la alimentación de la levadura, siendo ésta información confidencial.

La duración de la fermentación en todos los tipos de levadura es de 15 horas, y media hora de maduración para garantizar la estabilidad de la biomasa generada.

Se producen cuatro tipos de levaduras: levadura de fermentación normal, levadura de fermentación rápida, levadura de fermentación osmotolerante y levadura de fermentación especial. Todas las fermentaciones utilizan *Saccharomyces cerevisiae* diferenciándose unos tipos de otros por el tipo de cepa y el modelo productivo utilizado. Las características de cada tipo de levadura en el producto final están bien diferenciadas.

En este trabajo se estudiará la levadura osmotolerante, adecuada para utilizar en masas azucaradas, ya que soporta altas concentraciones de azúcar debido a que está adaptada para resistir una presión osmótica elevada (Attfield & Kletsas, 2000; Hernandez-Lopez, et al., 2003).

## **1.2. Limpieza CIP**

### **1.2.1. Proceso de limpieza en fábrica de producción de levadura industrial.**

En la industria alimentaria el plan de limpieza y desinfección es un conjunto de operaciones que tienen como fin eliminar la suciedad y mantener controlada la población microbiana, preparando las instalaciones para el siguiente ciclo productivo (Salo et al., 2008). De este modo, si se realiza de una forma correcta se contribuye a la producción y manipulación higiénica y segura de los alimentos y a una mejor calidad del producto final.

Los equipos e instalaciones son sometidos a intensas operaciones de limpieza y desinfección para conseguir los requerimientos higiénicos. La forma, medios y frecuencia para realizar dichas operaciones varían según el tipo de productos y los tipos de procesos.

Existen diferentes procesos de limpieza en la industria alimentaria, uno de ellos son los sistemas de limpieza CIP (del inglés “Cleaning in place”, es decir, limpieza *in situ*), que se emplean para la limpieza de superficies interiores de equipos cerrados (depósitos, tuberías, centrifugas, etc.). La limpieza CIP es un proceso automático utilizado en plantas industriales para devolver sus instalaciones al estado limpio después de terminar un ciclo productivo, que consiste en hacer circular a través del circuito de depósitos y líneas de proceso una serie de soluciones de limpieza en circuito cerrado desde los depósitos de preparación de estas soluciones, de acuerdo con unas secuencias y unos tiempos establecidos a priori (Moerman & Leuven, 2014). La mayor parte de los agentes de limpieza empleados son soluciones acuosas básicas y/o ácidas.

La planta industrial donde se realiza este estudio cuenta con un sistema de limpieza CIP, en el que hay una Central CIP de alto grado de automatización ya que almacena, prepara, distribuye, controla y ajusta la concentración y la temperatura de las soluciones empleadas en la limpieza (O’Rourke, 2003; Goode et al., 2010). Cada depósito de solución de limpieza cuenta con una válvula de toma de muestra, indicador de nivel, medidor de conductividad y en el caso del depósito de sosa, medidor y controlador de temperatura. Se trata de un circuito de limpieza cerrado con el fin de recuperar las soluciones empleadas durante el proceso. Las soluciones de limpieza son enviadas mediante bombas desde los depósitos de la Central CIP a los fermentadores y separadoras. Una vez completado el proceso, las soluciones vuelven a los depósitos de la Central CIP a través del circuito de retorno.

El medidor de conductividad instalado en el circuito permite controlar la conductividad de las soluciones utilizadas en cada etapa y de esta manera, se pueden recuperar las soluciones de limpieza durante el CIP asegurando el parámetro de concentración durante el tiempo de circulación establecido. Es decir, cuando la conductividad detectada por el medidor sea inferior a 23 mS, se cerrará la válvula del depósito de sosa o ácido nítrico y se abrirá la válvula del depósito de agua recuperada.

Se distinguen cuatro depósitos: uno de sosa cáustica con una concentración del 1,5%, otro de ácido nítrico al 1,3%, el tercero de lejía y un cuarto depósito de agua

recuperada. Junto con la sosa caústica se emplea el aditivo detergente de limpieza DEPTA+ cuyas propiedades como mojante, antiespumante y complejante, ayudan a conseguir un mayor arrastre de la suciedad y disminuir la cantidad de sosa usada. El producto DEPTA+ se incluye dentro de la definición de la letra E del anexo I del Real Decreto 770/1999, como producto para la limpieza de la industria alimentaria y cumple los requisitos del citado Real Decreto así como el Reglamento Europeo 648/2004 de 31 de marzo de 2004, sobre detergentes.

### **1.2.2. Control de la limpieza CIP.**

La conductividad electrolítica es una medida de la capacidad que tiene una solución acuosa para transmitir una corriente eléctrica y es igual al recíproco de la resistividad de la solución. La medida de la conductividad se utiliza para controlar diferentes procesos en la industria alimentaria, ya que este parámetro depende de la presencia de iones; de su concentración, movilidad y valencia, y de la temperatura.

En la planta de producción industrial de levadura se emplea la medida de conductividad como parámetro de control de la concentración de las soluciones de limpieza y así validar la conformidad respecto a los parámetros establecidos. Se realiza la medida de conductividad de las soluciones de limpieza, que varía con su concentración química, siendo la conductividad en soluciones acuosas directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos.

Las soluciones diluidas cumplen la Ley de Kohlrausch de la dependencia de la concentración según la ecuación:

$$\wedge = \wedge^{\infty} - Kc^{1/2}$$

donde  $\wedge$  es la conductividad molar,  $\wedge^{\infty}$  la conductividad molar límite, K es una constante empírica y c es la concentración del electrolito (Atkins et al., 2013).

### **1.2.3. Protocolos de limpieza CIP de la planta industrial de levadura.**

En la planta industrial de levadura podemos diferenciar dos partes, las cuales tienen diferentes protocolos de limpieza CIP:

- **FERMENTADORES:** están compuestos por una lanza o cabezal rotativo de limpieza situado en la parte superior, que gracias a sus rodamientos hidrodinámicos gira con la presión que le ejerce la bomba a la solución de limpieza y así, el líquido es proyectado a través de dos toberas de chorro. La presión de trabajo es de 11 bares, al tratarse de un presión elevada se



consigue un amplio diámetro de alcance y resulta más eficiente en la eliminación de la suciedad con un menor caudal. Por el contrario, de acuerdo al estudio realizado por Salo et al. (2008), la parte inferior de este tipo de depósitos es el área más difícil de limpiar, siendo necesario realizar una inundación del fondo del fermentador.

En los fermentadores durante la semana, la limpieza CIP solamente se realiza con sosa más aditivo y al finalizar ésta, se limpian con sosa más aditivo y ácido. El CIP de los fermentadores cuenta con dos bombas de impulsión (Figura 1):

- A. Bomba de alta presión (AP) y bajo caudal: la elevada presión hace posible el giro del cabezal o lanza de limpieza cuyo objetivo es limpiar toda la superficie interna del fermentador mediante fuerza mecánica.
- B. Bomba de baja presión (BP) y alto caudal: el alto caudal permite que la solución de limpieza llene rápidamente el fondo del fermentador a través de la parrilla de aireación y se consiga su limpieza por inundación.

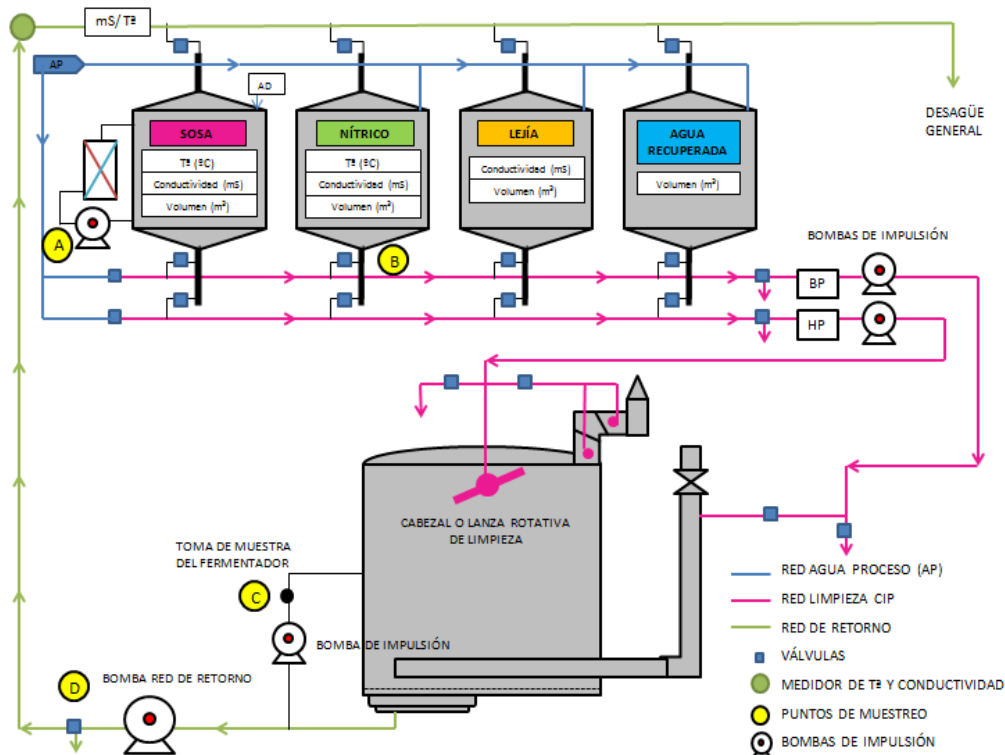


Figura 1: Esquema de limpieza CIP de los fermentadores.

Mediante un Controlador Lógico Programable se lleva a cabo de forma automática la limpieza CIP de los fermentadores. En la tabla 1 se recogen las diferentes etapas:

ETAPA	DESCRIPCIÓN	PARÁMETROS
<b>Pre-enjuague</b>	Se realiza con agua recuperada durante el tiempo establecido, eliminando los restos más groseros. Después se vacían los restos de agua acumulados en el fermentador por las tuberías de desagüe general.	Tiempo: 120 s bomba BP Tiempo: 180 s bomba AP Tª: ambiente
<b>Enjuague inicial</b>	Se realiza con agua recuperada durante el tiempo establecido. Después se vacían los restos de agua acumulados en el fermentador por las tuberías de desagüe general.	Tiempo: 2 min bomba BP Tiempo: 5 min bomba AP Tª: ambiente
<b>Limpieza alcalina (sosa caústica + aditivo DEPTA+)</b>	En primer lugar, se realiza un empuje con sosa caústica + aditivo hasta el desagüe general, previo paso por el medidor de conductividad. Cuando se detecta una conductividad (*) mayor a 23 mS se abre la válvula de entrada del depósito de sosa y se cierra la válvula del desagüe general. A partir de ese momento se recircula la solución durante 40 min.	Tiempo: 40 min Tª: 70- 80 °C Concentración: 1,5%
<b>Enjuague final</b>	Se realiza un empuje con agua de proceso hasta el depósito de sosa, previo paso por el medidor de conductividad. En el momento que el medidor (*) detecta una conductividad menor a 23 mS, se abre la válvula de entrada del depósito de agua recuperada y se cierra la válvula del depósito de sosa, se lleva el agua de proceso utilizada en el enjuague al depósito de agua recuperada durante el tiempo establecido.	Tiempo: 5 min Tª: ambiente
<b>Escurrido</b>	De forma automática se abren todas las purgas para eliminar los restos de agua acumulados en todo el circuito.	Tiempo: 5 min Tª: ambiente

(\*) Medidor de conductividad en el circuito retorno: realiza las discriminaciones

Tabla 1: Etapas de limpieza CIP de los fermentadores

- SISTEMA DE SEPARADORAS: las instalaciones que forman parte del sistema de separadoras son las máquinas centrífugas, intercambiadores de calor, bombas, válvulas y tuberías asociadas al sistema. Su limpieza CIP consta de una etapa más que la de los fermentadores, en la cual utiliza diariamente una solución de ácido nítrico para eliminar posibles incrustaciones.

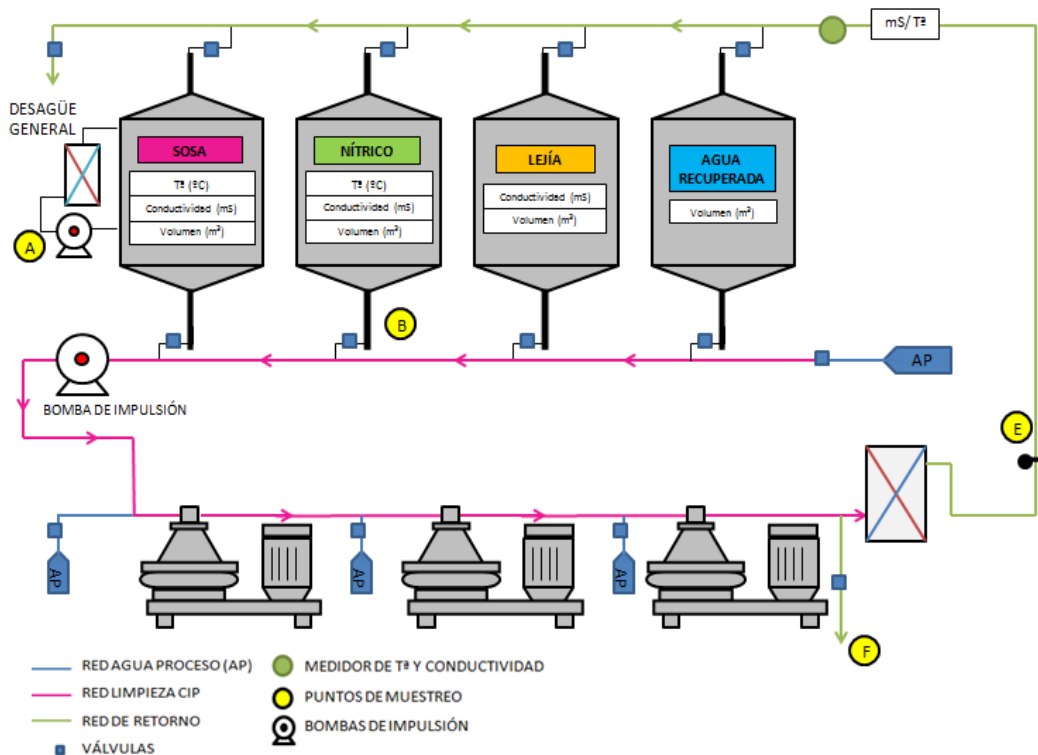


Figura 2: Esquema de limpieza CIP del sistema de separadoras.

Mediante un Controlador Lógico Programable se lleva a cabo de forma automática la limpieza CIP del sistema de separadoras, en la siguiente tabla 2 se recogen las diferentes etapas:

ETAPA	DESCRIPCIÓN	PARÁMETROS
Enjuague inicial	Se realiza con agua recuperada durante el tiempo establecido. Después se vacían los restos de agua acumulados en el fermentador por las tuberías de desagüe general.	Tiempo: 2 min Tª: ambiente
Limpieza alcalina (sosa + aditivo DEPTA+)	En primer lugar, se realiza un empuje con sosa cáustica + aditivo hasta el desagüe general, previo paso por el medidor de conductividad. Cuando se detecta (*) una conductividad mayor a 23 mS se abre la válvula de entrada del depósito de sosa y se cierra la válvula del desagüe general. A partir de ese momento se recircula la solución durante 40 min.	Tiempo: 30 min Tª: 70- 80 °C Concentración: 1,5%
Enjuague intermedio	Se realiza un empuje con agua de proceso hasta el depósito de sosa con el objetivo de eliminar los restos de sosa, previo paso por el medidor de conductividad. En el momento que el medidor (*) detecta una conductividad menor a 23 mS, se abre la válvula de entrada del depósito de agua recuperada y se cierra la válvula del depósito de sosa, se lleva el agua de proceso utilizada en el enjuague al depósito de agua recuperada durante el tiempo establecido.	Tiempo: 2 min Tª: ambiente
Limpieza ácida	Se realiza un empuje con ácido, el cual recircula por el circuito descrito durante el tiempo establecido. Cuando la conductividad registrada en el medidor (*) sea mayor a 23 mS, se cierra la válvula del depósito de agua recuperada y se abre el depósito de ácido.	Tiempo: 15 min Tª: ambiente Concentración: 1,3%
Enjuague final	Se realiza con agua de proceso durante el tiempo establecido para eliminar los restos de ácido. En el momento que el medidor (*) detecta una conductividad menor a 23 mS, se abre la válvula de entrada del depósito de agua recuperada y se cierra la válvula del depósito de ácido, se lleva el agua de proceso utilizada en el enjuague al depósito de agua recuperada durante el tiempo establecido.	Tiempo: 2 min Tª: ambiente
Escurreo	De forma automática se abren todas las purgas para eliminar los restos de agua acumulados en todo el circuito.	Tiempo: 5 min Tª: ambiente

(\*) Medidor de conductividad en el circuito retorno: realiza las discriminaciones

**Tabla 2:** Etapas de limpieza CIP del sistema de separadoras

En ambos sistemas de limpieza CIP hay que tener en cuenta:

- Después de cumplir el tiempo prefijado para cada etapa (enjuagues y limpieza alcalina y/o ácida) se realizan los flip-flops (descarga de las válvulas).
- Cuando el tanque de agua recuperada se vacía, se utiliza agua de proceso. No obstante, el agua recuperada solo se utiliza para las dos primeras etapas de pre-enjuague y enjuague inicial. El agua de proceso se emplea en el enjuague intermedio y enjuague final.
- El sistema CIP asegura un flujo turbulento a lo largo de las tuberías con el fin de conseguir un mayor arrastre de la suciedad.
- La concentración de las soluciones de limpieza de sosa y ácido se determina mediante curvas de calibrado donde se correlaciona la conductividad en función de la concentración (Anexo I).

#### 1.2.4. Validación de limpieza CIP en la planta industrial de levadura.

El concepto de validación de limpieza, que constituye un elemento fundamental en las industrias alimentarias, ha recibido una creciente atención en los últimos años. Según el *Codex Alimentarius* (CAC/GL 69-2008), la validación se define como la

obtención de pruebas que demuestren que una medida de control o la combinación de medidas de control, sí se aplican debidamente, son capaces de controlar un peligro con un resultado especificado. Dicho resultado debe de estar dentro de los niveles permisibles determinados y así, mantenerse por debajo de un nivel aceptable del peligro (Chisti et al., 1994).

El Código Alimentario (CAC/GL 69-2008) aporta las directrices para la validación de medidas de control, proporcionando asesoramiento a la industria y a los gobiernos. Estas directrices recogen información sobre las tareas previas a la validación, el enfoque o método de la validación, el proceso de la validación y la necesidad de una revalidación periódica.

Para poder validar la efectividad del sistema de limpieza CIP es necesario demostrar que las medidas de control establecidas en el Plan APPCC son capaces de lograr de manera constante el nivel previsto de control del peligro, en este caso se obtienen una serie de datos durante las condiciones normales de operación, que nos garanticen la efectividad de los procedimientos de limpieza (Timmerman, 2013). Para esto se requiere un buen conocimiento de los diferentes elementos que forman el sistema de limpieza CIP, desde el diseño y desarrollo del programa efectivo, de los métodos de análisis disponibles, de los métodos y puntos de muestreo.

En primer lugar, previamente a la definición del enfoque o método de validación, es necesario realizar una serie de tareas como:

- Identificar los peligros que se pretenden controlar en el producto o el entorno.
- Identificar el resultado requerido en materia de inocuidad de los alimentos.
- Identificar las medidas que han de validarse.

Una vez que se realizan dichas tareas, se concreta uno de los distintos métodos de validación de medidas de control. En este caso vamos a realizar la obtención de datos durante las condiciones normales de funcionamiento de la operación de limpieza. Cuando se aplica este método se obtienen datos biológicos, químicos o físicos relacionados con los peligros en cuestión por un periodo específico en condiciones de funcionamiento representativas de la operación alimentaria en su totalidad. Para ello se realizaron una serie de toma de muestras y análisis de las soluciones de limpieza y de las aguas de enjuague y escurrido final utilizadas en el CIP.

Un aspecto importante en las industrias alimentarias es el sistema de autocontrol, ya que se trata del método esencial reconocido por las normas internacionales (*Codex Alimentarius*), así como por las de la Unión Europea (Reglamento 852/2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios), cuya aplicación garantiza la seguridad e inocuidad de los alimentos en cada fase de la cadena alimentaria.

Todas las empresas alimentarias, a excepción de la producción primaria, están obligadas legalmente a aplicar un sistema de autocontrol, que debe fundamentarse en unas prácticas correctas de higiene y unas condiciones ambientales operativas adecuadas. Estos prerrequisitos se presentan en todas las etapas de producción de la planta industrial de levadura. Uno de ellos es el plan de limpieza y desinfección, que agrupa el conjunto de operaciones que tienen como fin eliminar la suciedad y mantener controlada bajo mínimos la carga microbiana. Para ello, se crea un árbol de decisiones como herramienta de control, que reúne una serie de preguntas para la toma de decisiones adecuadas teniendo diferentes alternativas posibles de acción (Anexo II).

## 2. OBJETIVOS

Una vez definido el contexto en el que se va a desarrollar este Trabajo Fin de Máster, fijaremos un objetivo común y principal a las dos partes que lo forman:

- “Optimización del proceso productivo y validación y mejora del sistema de limpieza CIP”.

Para lograr el objetivo principal se trabajó en el área de fermentación y el laboratorio de control de la planta industrial de levadura, y fue necesario determinar dos objetivos secundarios y una serie de objetivos parciales específicos para cada parte del trabajo:

1. “Estudiar las características de una nueva levadura osmotolerante de panadería”
  - a. Comparar las características de la levadura habitual producida a nivel industrial con las de la nueva levadura.
2. “Validar los protocolos de limpieza CIP de los fermentadores y del sistema de separadoras”.
  - a. Identificar los peligros y las medidas de control que se pretenden valorar.
  - b. Definir el enfoque de validación de las medidas de control.
  - c. Establecer los criterios de decisión.
  - d. Demostrar que el uso del aditivo detergente DEPTA+ junto con la sosa caústica en disolución a una conductividad de 70 mS en la limpieza CIP disminuye el gasto de sosa, consiguiendo resultados fisicoquímicos y microbiológicos óptimos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Análisis de la levadura fresca

- Se realizaron tres pruebas con la misma levadura en distintas condiciones (Levadura B0, B1 y B2) y se contrastaron tomando como referencia la levadura testigo A.

##### 3.1.1. Determinación del Poder Fermentativo de la levadura fresca (Fermentómetro Burrows y Harrison Automático y Risógrafo)

- *Principio:* determinación de la actividad fermentativa de la levadura en el seno de una masa mediante la medida del desprendimiento gaseoso producido.
- *Reactivos:* solución de levadura, solución salina que aporta la sal necesaria a la receta, harina y sacarosa.
- *Equipo:* fermentómetro en una sala climatizada a  $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.2. Análisis de Poder Fermentativo en conservación

- *Test rápido:* se somete la levadura fresca a  $35^{\circ}\text{C}$  en estufa durante 24 horas para verificar que sus características organolépticas no se ven alteradas.
- *Test control:* se somete la levadura fresca a una temperatura constante de  $21^{\circ}\text{C}$  durante 7 días para comprobar que su poder fermentativo y sus características organolépticas no se ven alteradas durante su vida útil.

##### 3.1.3. Determinación de la materia seca celular (g/Kg) en levadura fresca.

- *Principio:* se cuantifica la materia seca celular en g/Kg. Contendida en un mosto por filtración a vacío de un peso conocido. El resultado está referido en g/Kg para un contenido de materia seca del 32% (valor estándar común del grupo para todas las fábricas).
- *Materiales:* crisol de placa filtrante, instalación de vacío, balanza de precisión Mettler Toledo, estufa de secado, desecador y pipeta aforada.

#### 3.2. Análisis del sistema de limpieza CIP

##### 3.2.1. Análisis físicoquímicos

- *Materiales y equipos utilizados:* pH-metro Crison (modelo Basic 20), conductímetro Crison (modelo Basic 30) y termómetro de alcohol de escala 10 a  $110^{\circ}\text{C}$  (precisión:  $0,1^{\circ}\text{C}$ ).
- *Reactivos utilizados:*  $\text{HNO}_3$  69% y NaOH 1N Merck Millipore.

### 3.2.2. Análisis microbiológicos

- *Materiales y equipos utilizados:* campana de flujo laminar, estufa de cultivo Memmert IN 110, mechero BÜNSEN, frascos estériles para toma de muestras, placas PETRI , pipetas graduadas estériles.
- *Medios de cultivo y reactivos utilizados:*
  - Recuento de gérmenes totales mesófilos: Agar en placa estándar (Agar PCA: Plate Count Agar).
  - Recuento de coliformes totales en Violeta Rojo Bilis: Agar Lactosado.
  - Recuento de coliformes fecales, *Escherichia coli* en Violeta Rojo Bilis Agar-Mug.
  - Estimación del nivel de contaminación en coliformes fecales y *Escherichia coli* (Medio de Schubert “Pasteur”).
  - Solución de tiosulfato de sodio (Ringer): se añade 1 ml a las muestras para anular el efecto del cloro presente en el agua, con el fin de evitar interferencias en los resultados de los análisis microbiológicos.

### 3.2.3. Detección de ATP mediante luminiscencia

La bioluminiscencia es una técnica rápida de control microbiológico que sirve para evaluar el estado higiénico de las instalaciones de la industria alimentaria, ya que permite medir los niveles residuales de restos orgánicos o microbiológicos en superficies y aguas (Lappalainen et al., 2000). Esta prueba está basada en la detección de materia orgánica-ATP (Adenosin Trifosfato), que está presente en todas las células vivas (Cartón, et al., 2011). Para recoger las muestras se utilizan hisopos, que se introducen en un medio reactivo en el que está presente la enzima luciferasa que cataliza la reacción del ATP con la luciferina, el producto final de dicha reacción va asociado a la emisión de luz (Ilyina, et al., 1998). Esta luz es medida utilizando un luminómetro, cuya unidad de medida se conoce como Unidades Relativas de Luz (URL).

En la planta industrial de producción de levadura el monitoreo se lleva a cabo en las aguas de enjuague y escurrido final de los fermentadores y separadoras de la línea de producción en el sistema de limpieza CIP.

- *Materiales y equipos utilizados:* hisopos 3M Clean-Trace™ Water Plus Total ATP (REF. AQT200) y luminómetro Clean-Trace™ NG (Bioser).



Los valores de referencia del estado higiénico de fermentadores y separadoras que se han utilizado en este trabajo se recogen en la tabla 3:

VALORES DE REFERENCIA DEL ESTADO HIGIÉNICO DE FERMENTADORES Y SEPARADORAS			
	APROBADO	PRECAUCIÓN	SUSPENSO
ATP (URL)	0-300	301-500	>500

Tabla 3: Valores orientativos de ATP en URL sobre la higiene de las aguas de enjuague y escurrido final

#### 3.2.4. Método de validación de limpieza CIP

El método tomado como referencia para realizar la validación del sistema de limpieza CIP en la planta industrial de producción de levadura es el documento oficial del Codex Alimentarius “Directrices para la Validación de Medidas de Control de la Inocuidad de los Alimentos CAC/GL 69-2008” (Codex, 2008).

Los cambios realizados en el proceso de limpieza del sistema CIP como es la reducción de la conductividad a 70 mS de la sosa cáustica y la adicción del nuevo aditivo detergente DEPTA+, resultan en la necesidad de validar el sistema de control de inocuidad de la levadura de panadería en su totalidad.

a) Tareas previas y enfoque a la validación:

En primer lugar, fue necesario identificar los posibles peligros biológicos debidos al crecimiento microbiano por una limpieza deficiente de algunos equipos y tuberías, y peligros químicos debidos a la presencia de restos de productos de limpieza en todo el sistema. Posteriormente, se determina el enfoque o método para realizar la validación, se realiza la obtención de datos durante las condiciones normales de limpieza CIP de los fermentadores y las separadoras. Para ello, se tomaron muestras y se realizaron análisis de las soluciones de limpieza y de las aguas de enjuague y escurrido utilizadas en el CIP.

b) Protocolo de validación:

Se realizó una revisión de los protocolos de limpieza CIP utilizados en la planta industrial de levadura con el fin de identificar lo siguiente:

- Soluciones de limpieza utilizadas y sus parámetros (conductividad, temperatura, tiempo de contacto y caudal para lograr el efecto mecánico).
- Etapas de limpieza CIP (enjuague inicial, limpieza alcalina, enjuague intermedio, limpieza ácida, enjuague final y escurrido final).

- Estudio del diseño del sistema CIP (depósitos, separadoras, tuberías y bombas).

Una vez identificados y estudiados todos los puntos mencionados, se elabora un protocolo de validación en el que se recoge paso a paso el proceso de validación. El protocolo de validación del sistema de limpieza CIP a escala real se llevó a cabo durante el periodo de realización de mis prácticas en la empresa con el fin de obtener resultados de 10 limpiezas.

Se tomaron muestras de las soluciones de limpieza de las instalaciones del sistema de limpieza CIP según la planificación de producción semanal. Los resultados se pueden extrapolar a todos los fermentadores y separadoras utilizados en la fábrica ya que:

- Mismo tipo de limpieza CIP para los equipos, mismo material de construcción y diseño de los equipos.
- Limpiezas automatizadas y vigiladas bajo el mismo Controlador Lógico Programable, por tanto todos los equipos asociados a la misma Central CIP utilizan las mismas soluciones de limpieza.

La limpieza CIP de los fermentadores y separadoras se realiza de forma simultánea y las soluciones utilizadas tienen como origen los mismos depósitos de sosa y ácido de la Central CIP.

c) Selección del momento y de los puntos de muestreo:

Los puntos de muestreo seleccionados en los fermentadores se indican en la figura 1, y se recogen junto con los momentos de muestreo en la tabla 4:

FERMENTADORES	
Momento de muestreo	Punto de muestreo
1. Antes de empezar la limpieza con sosa	Depósito de sosa de la Central CIP (Punto A)
2. A los 5 min de empezar la limpieza con sosa	Toma de muestra del fermentador (Punto C)
3. A los 35 min de empezar la limpieza con sosa	Toma de muestra del fermentador (Punto C)
4. Al finalizar la limpieza con sosa	Depósito de sosa de la Central CIP (Punto A)
5. A los 3 min del enjuague final	Toma de muestra del fermentador (Punto C)
6. Durante el escurrido final	Válvula de purga del fermentador (Punto D)

**Tabla 4:** Momentos y puntos de muestro en fermentadores correspondientes a la Figura 1.

Los puntos de muestreo seleccionados en el sistema de separación se encuentran indicados en la figura 2. A continuación se recogen en la tabla 5 los momentos y los puntos de muestreo:

SEPARADORAS	
Momento de muestreo	Punto de muestreo
1. Antes de empezar la limpieza con sosa	Depósito de sosa de la Central CIP (Punto A)
2. A los 5 min de iniciar la limpieza con sosa	Toma de muestra del intercambiador de calor (Punto E)
3. A los 25 min de empezar limpieza con sosa	Toma de muestra del intercambiador de calor (Punto E)
4. Al finalizar la limpieza con sosa	Depósito de sosa de la Central CIP (Punto A)
5. Antes de iniciar la limpieza con ácido	Depósito de nítrico de la Central CIP (Punto B)
6. A los 7 min de la limpieza con ácido	Toma de muestra del intercambiador de calor (Punto E)
7. Al final de la limpieza con ácido	Depósito de nítrico de la Central CIP (Punto B)
8. Durante el primer minuto del enjuague final	Toma de muestra del intercambiador de calor (Punto E)
9. Durante el primer minuto escurrido final	Válvula de purga de las separadoras (Punto F)

**Tabla 5:** Momento y puntos de muestro en separadoras correspondientes a la Figura 2.

#### d) Control fisicoquímico y microbiológico

Durante la limpieza CIP se tomaron muestras de sosa, ácido y aguas de enjuague y escurrido final para reunir los datos necesarios para verificar si los parámetros del CIP son capaces de lograr la validación de la limpieza CIP.

En la tabla 6 se recoge el tipo de análisis realizado a cada muestra tomada, tanto en fermentadores como en separadoras:

FERMENTADORES			
Muestra	Determinación analítica	Momento de muestreo	Punto de muestreo
Sosa caústica 1,5%	Conductividad (mS) Temperatura (°C)	Antes de empezar la limpieza con sosa	A
		A los 5 min de empezar la limpieza con sosa	C
		A los 35 min de empezar la limpieza con sosa	C
		Al finalizar la limpieza con sosa	A
Agua de enjuague	Conductividad (mS), pH y análisis microbiológico	A los 3 min del enjuague final	C
Agua de escurrido	Conductividad (mS), pH, ATP y análisis microbiológico	Durante el escurrido final	D
MÁQUINAS SEPARADORAS			
Muestra	Determinación analítica	Momento de muestreo	Punto de muestreo
Sosa caústica 1,5%	Conductividad (mS) Temperatura (°C)	Antes de empezar la limpieza con sosa	A
		A los 5 min de empezar la limpieza con sosa	E
		A los 25 min de empezar la limpieza con sosa	E
		Al finalizar la limpieza con sosa	A
Ácido nítrico 1,5%	Conductividad (mS)	Antes de iniciar la limpieza con ácido	B
		A los 7 min de empezar la limpieza con ácido	E
		Al finalizar la limpieza con ácido	B
Agua de enjuague	Conductividad (mS), pH y análisis microbiológico	Durante el primer minuto del enjuague final	E
Agua de escurrido	Conductividad (mS), pH, ATP y análisis microbiológico	Durante el primer minuto del escurrido final	F

**Tabla 6:** Análisis realizados en las muestras tomadas

En los análisis microbiológicos de las aguas de enjuague y escurrido final se determinaron gérmenes totales, coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* mediante la técnica de recuento en placa por siembra en masa. Para inactivar el cloro libre de éstas aguas, que podría alterar los resultados, se utilizó tiosulfato de sodio.

e) Criterios de decisión

Para lograr la validación del protocolo de limpieza CIP modificado, los fermentadores y el sistema de separadoras, que están en contacto con el producto, deben cumplir con los criterios establecidos en la tabla 7:

ETAPA	LÍMITE	APROBADO	PRECAUCIÓN	SUSPENSO
Enjuague y escurrido final	Fisicoquímicos	Conductividad a 20 °C: 3-4 mS	Conductividad a 20 °C: 4,1-7 mS	Conductividad a 20 °C: >7 mS
	Microbiológicos	Gérmenes totales: <10 ufc/ml Coliformes totales: 0 ufc/ml Coliformes fecales: 0 ufc/ml <i>E.coli</i> : 0 ufc/ml	Gérmenes totales: 10- 99 ufc/ml Coliformes totales: 0 ufc/ml Coliformes fecales: 0 ufc/ml <i>E.coli</i> : 0 ufc/ml	Gérmenes totales: >100 ufc/ml Coliformes totales: 0 ufc/ml Coliformes fecales: 0 ufc/ml <i>E.coli</i> : 0 ufc/ml

Tabla 7: Criterios de decisión para la validación del sistema de limpieza CIP

La conductividad y los resultados microbiológicos, del agua del enjuague final y del escurrido final, se establecen como criterios de decisión principales a fin de evaluar la efectividad de la limpieza en la eliminación de los agentes detergentes y de la carga microbiana.

Antes de establecer los límites de decisión de conductividad es necesario tener en cuenta la conductividad del agua de proceso utilizada en la limpieza, que se encuentra entre 3 y 3,3 mS, así como el Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

### 3.2.5. Análisis estadístico de los resultados

En la realización de este trabajo los datos se trataron con Microsoft Office Excel 2007 y el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII-X64.

a) RESULTADOS DE LA NUEVA LEVADURA

- Los resultados obtenidos en las tres pruebas experimentales realizadas en la planta industrial de la nueva levadura osmotolerante (levadura B0, B1 y B2) y de la levadura testigo A se recogen en la tabla 7.
- Los resultados de la tasa de crecimiento de la levadura osmotolerante testigo A, y de las tres pruebas de la levadura B a estudiar (levadura B0, B1 y B2), se representan en un gráfico (figura 3) con el fin de comparar la evolución de su crecimiento durante las 15 horas de fermentación.

b) RESULTADOS DEL SISTEMA DE LIMPIEZA CIP

- Los resultados de conductividad de las aguas de enjuague final y escurrido final fueron representados en gráficos de control por variables respecto al total de muestras tomadas, con el fin de comprobar que la conductividad de la sosa está dentro de los límites aceptables para poder validar el sistema CIP.
- Los datos de evolución de temperatura durante la limpieza con sosa más aditivo se representan en un gráfico de líneas para visualizar la tendencia de la temperatura desde el inicio hasta el final de la etapa de la limpieza alcalina.
- Los valores de ATP obtenidos mediante el método de bioluminiscencia se recogen en una gráfica de líneas con el fin de observar el importante descenso que se ha producido al añadir el aditivo detergente DEPTA+ en la limpieza alcalina. Por otro lado, los resultados microbiológicos de gérmenes totales, coliformes totales, coliformes fecales y *E. coli*, se agrupan en la tabla 9.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Levadura osmotolerante de panadería

Los resultados obtenidos para las 3 pruebas realizadas de la nueva levadura osmotolerante (Levadura B0, B1 y B2) y los de la levadura testigo A se recogen en la tabla 8. En el ensayo de la levadura B se marcaron dos objetivos principales, conseguir un mayor rendimiento que el de la levadura A, y un poder fermentativo similar (FC20) sin alterar las características organolépticas y de conservación.

	Rendimiento	FC20	PFCO	Tasa de crecimiento total	Consistencia	Nitrógeno	Materia seca
Levadura A	73,89	176,99	138,03	11,18	7,05	7,21	32,13
Levadura B0	79,48	152,13	139,12	10,73	8,93	6,85	32,63
Levadura B1	80,94	161,45	132,54	11,53	3,76	7,79	30,22
Levadura B2	80,46	162,62	128,97	12,08	4,00	7,31	31,45

Tabla 8: Resultados de los diferentes parámetros de la nueva levadura osmotolerante

De los diferentes parámetros estudiados, se obtienen los siguientes resultados:

- Tras las 3 pruebas realizadas, se consigue un aumento del rendimiento en un 8,9% respecto a la levadura testigo A, alcanzando así uno de los objetivos principales.
- En el caso del poder fermentativo de la crema al 20% (FC20) no se alcanza el objetivo marcado, estando 14 puntos por debajo del límite de especificación. Por lo tanto, sería interesante seguir realizando pruebas para conseguir un equilibrio entre rendimiento y FC20, sin alterar las características organolépticas y de conservación.
- Respecto al poder fermentativo en conservación (PFCO), se observa que en la primera prueba a estudiar B0, está dentro de los límites de especificación, siendo ligeramente superior al de la levadura testigo A pero en las siguientes pruebas sufre un descenso debido a que su materia seca también es menor.
- La consistencia, al igual que el PFCO, en la primera prueba B0 es similar a la de la levadura testigo A. Sin embargo, en la segunda y tercera prueba (B1 y B2) es inferior debido a que el valor de la materia seca está por debajo del valor de referencia ( $32,0 \pm 0,5$ ). Para que el valor de consistencia de las pruebas B1 y B2 esté dentro de los límites de especificación internos es necesario, además de alcanzar un valor óptimo de la materia seca, lograr el equilibrio entre el crecimiento de la levadura y el nitrógeno, ya que son estos dos parámetros los que afectan de forma negativa a la consistencia de la levadura.

Una vez conseguido el objetivo principal de aumentar el rendimiento, se pretende llegar a unos valores óptimos del resto de parámetros analizados. Según Rose y Harrison (2012), el poder fermentativo de la levadura está condicionado por la relación directa existente entre la tasa de crecimiento y el porcentaje de nitrógeno y fósforo de la levadura (%N y %P). En las tres pruebas se observa como el crecimiento por hora (figura 3) y el crecimiento total (tabla 8) van aumentando prueba a prueba, así como su composición, esto se debe a las variaciones realizadas en el medio de crecimiento durante la fermentación.

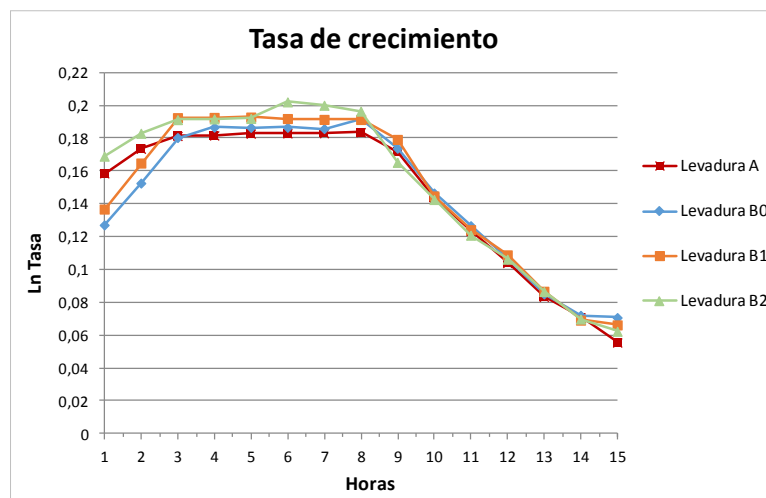


Figura 3: Gráfica de control de temperatura de sosa durante la limpieza alcalina

La figura 3 refleja como el crecimiento de la levadura va cambiando durante la fermentación. En las pruebas B0 y B1 tiene una menor tasa de crecimiento al inicio de la fermentación que la levadura A, pero a medida que el tiempo aumenta esta tasa supera a la de la levadura testigo A. Por otro lado, en la prueba B2 la tasa de crecimiento es mayor a la de la levadura testigo A durante toda la fermentación. Esta diferencia en las tasas de crecimiento de las tres pruebas se debe a la cantidad de nutrientes proporcionados. Según la ecuación de Monod existe una relación entre el crecimiento de la levadura y la cantidad de sustrato presente en el medio, por lo tanto, cuanto más melaza se aporta a la levadura mayor es su tasa de crecimiento.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S}$$

Donde:  $\mu$  = velocidad específica de crecimiento celular

$\mu_{m\acute{a}x}$  = velocidad específica máxima de crecimiento

S = concentración del sustrato limitante

$K_s$  = constante de velocidad de crecimiento

## 4.2. Limpieza CIP

### 4.2.1. Control fisicoquímico

#### 4.2.1.1. Conductividad de la sosa durante la limpieza alcalina

En las figuras 4 y 5 se representa la conductividad de la solución de limpieza de sosa de las diez muestras tomadas en los momentos de muestreo 1 y 4 en el Depósito Central CIP, antes y después de realizar la limpieza alcalina, respectivamente. A partir de este punto, en todos los gráficos en los que se representa la conductividad aparecen los mismos límites de control (líneas verdes de los extremos): límite inferior de control (LIE), límite superior de control (LSE) y valor nominal (línea verde central). La línea roja central que aparece en todas las figuras representa los valores medios de conductividad de las diez muestras.

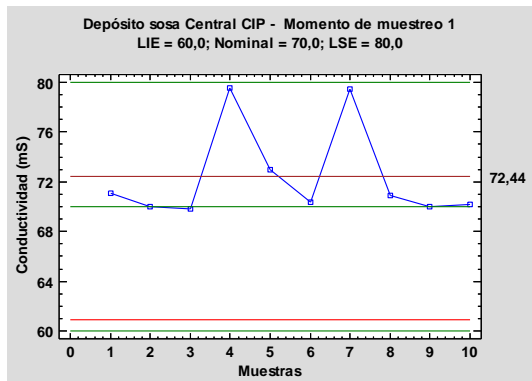


Figura 4: Gráfica de control de conductividad de sosa en el Depósito Central CIP (Momento de muestreo:1)

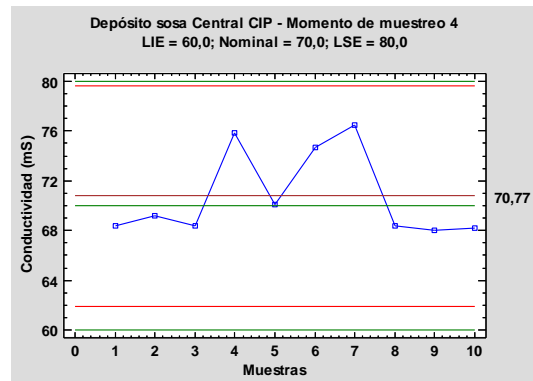


Figura 5: Gráfica de control de conductividad de sosa en el Depósito Central CIP (Momento de muestreo:4)

En la figura 4, se observa que antes de comenzar con la limpieza alcalina (momento de muestreo 1), los valores de conductividad de sosa del Depósito Central CIP están muy próximos a la línea central (valor nominal 70 mS), excepto los dos puntos máximos correspondientes a la limpieza de un depósito de levadura madre donde la conductividad se modificó a 80 mS.

En la figura 5, la conductividad de la sosa en algunas de las muestras tomadas están por debajo de la línea central (valor nominal 70 mS) pero dentro de los límites de control. Aparecen dos valores máximos de conductividad que coinciden con los máximos de la figura 4 correspondientes a la limpieza del depósito de levadura madre.

La tendencia de la conductividad de la sosa en ambas gráficas es similar pero comprobamos que hay un descenso de la conductividad media en la figura 5, esto es debido a que el sistema de limpieza CIP es capaz de realizar limpiezas de los fermentadores, separadoras y otras instalaciones de la fábrica de forma simultánea utilizando la sosa del mismo depósito. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de



limpiezas con sosa que se estén realizando, mayor será el descenso de la conductividad. Cuando el medidor de conductividad del depósito de sosa detecta que se encuentra por debajo de 70 mS, de forma automática realiza inyecciones de sosa concentrada a fin de mantener la sosa del depósito en la conductividad objetivo.

Las figuras 6 y 7 representan los valores de conductividad durante la limpieza alcalina en fermentadores y separadoras.

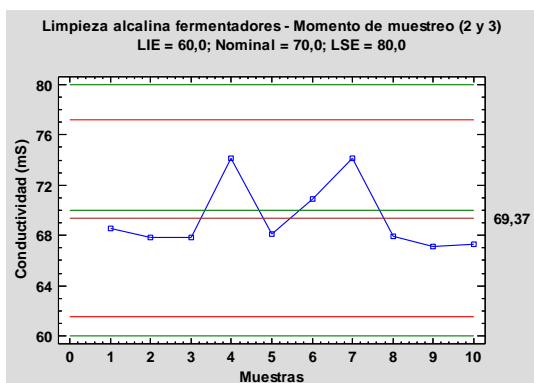


Figura 6: Gráfica de control de limpieza alcalina en fermentadores (Momento de muestreo 2 y 3)

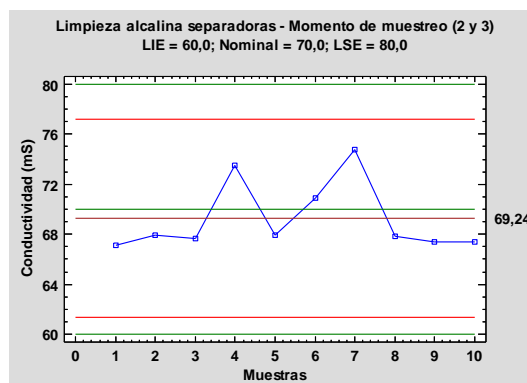


Figura 7: Gráfica de control de limpieza alcalina en separadoras (Momento de muestreo 2 y 3)

La toma de muestras durante la limpieza alcalina, tanto en fermentadores como en separadoras, es otra forma de controlar que la conductividad de la sosa es adecuada. En las figuras 6 y 7 podemos observar que la conductividad se encuentra dentro de las límites de control. La media de los valores de la conductividad de sosa está alrededor de los 69 mS, por lo tanto estamos cumpliendo el objetivo de reducir la conductividad de la sosa debido al uso del aditivo DEPTA+ con el fin de mejorar la eficacia de la sosa en el proceso de limpieza.

#### 4.2.1.2. Temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina

La figura 8 representa la evolución de la temperatura durante la limpieza alcalina en el punto de muestreo A (Depósito de sosa Central CIP).

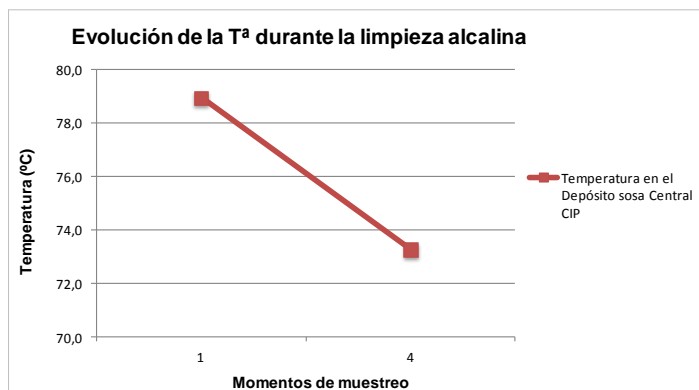


Figura 8: Gráfica de control de temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina

Durante la limpieza alcalina de separadoras y fermentadores también es importante controlar el parámetro de temperatura, ya que éste influye en la efectividad que la sosa tiene en el arrastre de la suciedad. El rango de temperatura de la solución de sosa debe estar entre 70 y 80°C para que sea efectiva. En la figura 8 se observa que la temperatura durante la limpieza alcalina está siempre por encima de 70°C, como se indica en los protocolos de limpieza.

#### 4.2.1.3. Conductividad del ácido nítrico durante la limpieza ácida

En las figuras 9 y 10 se representan, respectivamente, los valores de conductividad del ácido nítrico en el depósito de la Central CIP antes de empezar la limpieza ácida, y los valores de la conductividad cuando ha finalizado dicha limpieza.

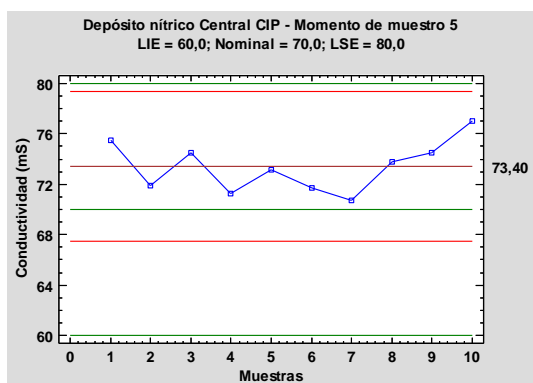


Figura 9: Gráfica de control de conductividad del nitrato en el Depósito Central CIP (Momento de muestreo: 5)

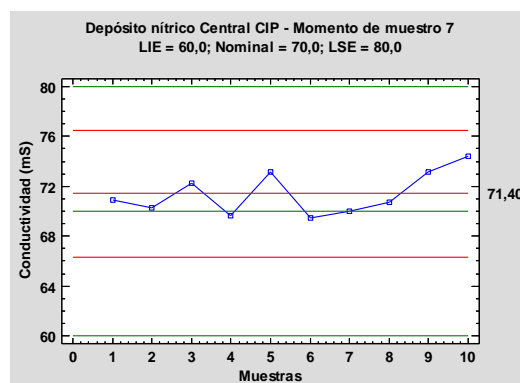


Figura 10: Gráfica de control de conductividad del nitrato en el Depósito Central CIP (Momento de muestreo: 7)

Analizando los datos representados en ambas figuras se observa que la conductividad después de la limpieza es menor debido a que el ácido se va consumiendo a medida que es utilizado en el CIP.

La figura 11 representa la conductividad de las muestras tomadas a los 7 minutos de la limpieza ácida, los valores aseguran que el proceso de limpieza con ácido es capaz y opera dentro de los límites de control establecidos.

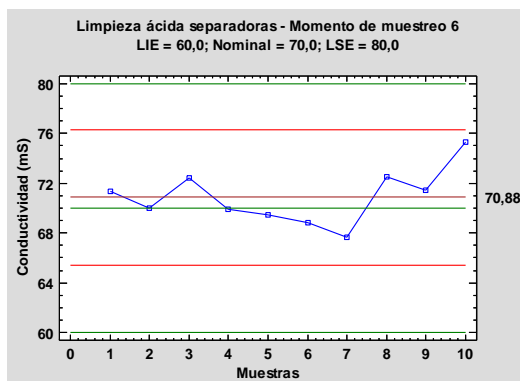


Figura 11: Gráfica de control de limpieza ácida en separadoras (Momento de muestreo: 6)

#### 4.2.1.4. Conductividad de las aguas de enjuague y escurrido final

En las figuras 12 y 13 se registran los valores de conductividad del agua de enjuague y escurrido final correspondientes a los fermentadores y separadoras.

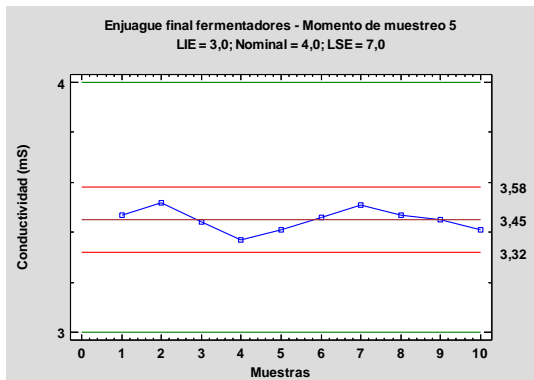


Figura 12: Gráfica de control del enjuague final en fermentadores (Momento de muestreo: 5)

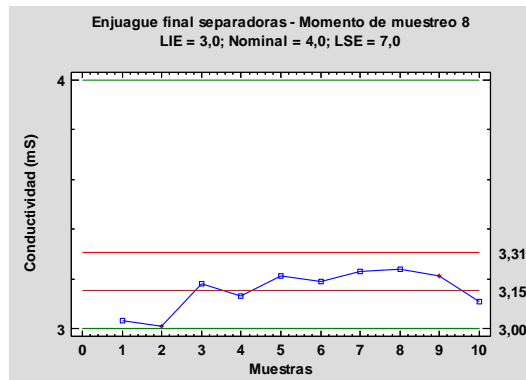


Figura 13: Gráfica de control del enjuague final en separadoras (Momento de muestreo: 8)

La línea azul corresponde a los controles de conductividad del agua durante el enjuague final en fermentadores y separadoras (momentos de muestreo 5 y 8, respectivamente). Se observa que la conductividad durante el enjuague en fermentadores está entre 3.3 y 3.6 mS y en separadoras, entre 3 y 3.3 mS. Estos valores están dentro de los límites establecidos en los criterios de decisión para poder realizar la validación (tabla 7).

Las figuras 14 y 15 representan la conductividad del agua del escurrido final en fermentadores y separadoras.

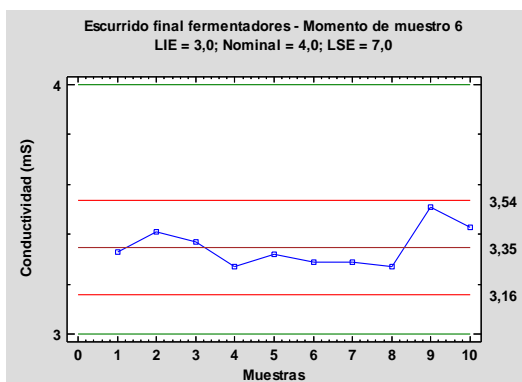


Figura 14: Gráfica de control del escurrido final en fermentadores (Momento de muestreo: 6)

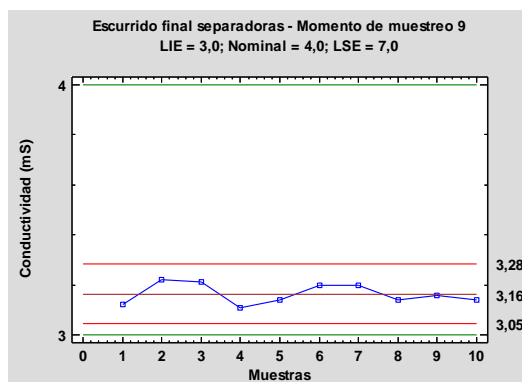


Figura 15: Gráfica de control del escurrido final en separadoras (Momento de muestreo: 9)

En las muestras de escurrido final, tanto de fermentadores como de separadoras, los valores de conductividad (línea azul) son óptimos, ya que se encuentran dentro de los límites establecidos en los criterios de decisión para validar los protocolos de limpieza del sistema CIP (tabla 7). En ambos casos, la conductividad se encuentra por debajo de 3,5 mS, lo que muestra la efectividad del enjuague y la completa eliminación de los agentes de limpieza.

Un aspecto a tener en cuenta es que en las aguas de enjuague final y escurrido final, la conductividad es mayor en los fermentadores. Esto es debido a que en las separadoras existe una etapa adicional de limpieza con ácido y el volumen de las centrífugas es mucho menor que el de los fermentadores.

#### 4.2.2. Resultados de ATP mediante bioluminiscencia

El método de bioluminiscencia de ATP aporta información sobre la presencia de microorganismos y residuos de materia orgánica, obteniendo los resultados de forma inmediata. Dichos resultados se expresan en Unidades Relativas de Luz (URL), siendo la cantidad de ATP directamente proporcional a la cantidad de luz emitida.

La bioluminiscencia permite obtener resultados rápidos, lo que representa una ventaja respecto a los métodos tradicionales utilizados en microbiología que ofrecen resultados en uno o varios días. Sin embargo, estos resultados son información orientativa, ya que la presencia de materia orgánica puede provocar interferencias y no solo se detecta la cantidad de microorganismos presentes en las muestras.

La figura 16 representa los valores de ATP obtenidos mediante el método de bioluminiscencia.

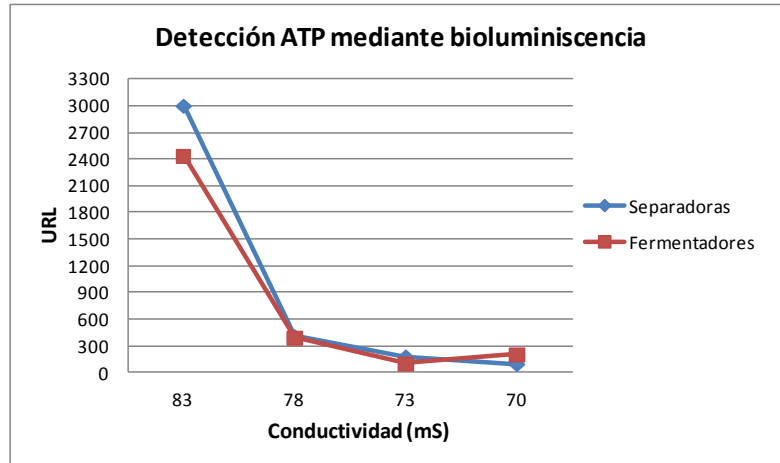


Figura 16: Resultados de ATP (URL) en fermentadores y separadoras a distinta

Los resultados de los análisis realizados durante cuatro semanas recogidos en la figura 16, muestran como los valores de ATP han ido disminuyendo a pesar de que la conductividad de la solución de sosa usada también se ha reducido. Este descenso podría deberse a la utilización del aditivo detergente de limpieza DEPTA+ junto con la sosa, que tiene un mayor poder de arrastre de la suciedad, tanto de materia orgánica como de posibles microorganismos, ya que se trata de un producto con diferentes propiedades: antiespumante, mojante y complejante.

#### 4.2.3. Resultados microbiológicos

Se lograron buenos resultados microbiológicos en todas las muestras tomadas (n = 40), tanto en las aguas de enjuague final y escurrido final de fermentadores y separadoras, de acuerdo a los criterios de decisión establecidos en la tabla 6. En el caso de gérmenes totales solamente se observaron:

- Fermentadores: un caso positivo de 1 ufc/ml en las 20 muestras analizadas (10 de enjuague final y 10 de escurrido final).
- Separadoras: dos casos positivos de 1 ufc/ml en las 10 muestras analizadas de enjuague final y otros dos casos positivos de 1 ufc/ml en las 10 muestras de escurrido final.

En los análisis de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*, los resultados fueron todos negativos, dando ausencia en todas las muestras.

#### 4.2.4. Balance económico del proceso de limpieza CIP

La tabla 9 refleja el balance económico del proceso de limpieza realizado en el presente trabajo.

BALANCE ECONÓMICO			
SOSA DE BASE	Litros ahorro sosa/ limpieza	10,12	<b>AHORRO €/ MES</b>
	Kg ahorra sosa/ limpieza	12,89	
	Nº de limpiezas/ día	49	
	Precio sosa (50%)	0,24 €/ Kg	
	Kg sosa 25%/ día	631,61	
	Kg sosa 25%/ mes	18948,30	
	€/ mes ahorro sosa	2273,79 €	
DEPTA+	Litros Depta+/limpieza	0,47	<b>AHORRO €/ AÑO</b>
	Kg Depta+/limpieza	0,49	
	Nº de limpiezas/día	49	
	Precio Depta+	1,9 €/ Kg	
	Kg Depta+/día	24,01	
	Kg Depta+/mes	721,30	
	coste €/mes	1368,57 €	
		<b>905,23 €</b>	<b>10862,71 €</b>

**Tabla 9:** Balance económico de la limpieza CIP

Con la modificación del sistema de limpieza CIP, reduciendo la conductividad de la sosa y añadiendo el aditivo detergente DEPTA+, se consigue una óptima limpieza y calidad microbiológica de las instalaciones de producción. Además se logra una mejora económica como objetivo secundario.

En la tabla 10 se observa que el ahorro de la sosa es mayor que el coste del aditivo detergente en la limpieza, por lo tanto el balance económico es positivo. El uso del DEPTA+ mejora la eficacia de la sosa, y se puede reducir la cantidad usada en las limpiezas. Esto supone un ahorro anual de 10862,71€.

## 5. CONCLUSIONES

Finalmente, con el trabajo realizado se obtienen las siguientes conclusiones:

- a) Optimización del proceso productivo de una nueva levadura osmotolerante:
  - Se consigue un mayor rendimiento en el proceso productivo de la nueva levadura osmotolerante. Este mayor rendimiento permite obtener una mayor producción de biomasa microbiana por kilogramo de melaza consumido, lo que supone un ahorro de materia prima y un menor coste del proceso productivo. No obstante, sería interesante realizar más pruebas para ver si se puede conseguir un equilibrio entre el rendimiento y los demás parámetros estudiados en el presente trabajo.
  
- b) Validación del sistema de limpieza CIP:
  - El análisis de los resultados de las muestras de la limpieza alcalina y ácida indica que el proceso de limpieza cumple los requisitos establecidos, ya que los resultados de la conductividad, tanto de la sosa como del ácido nítrico, y la temperatura de la sosa están dentro de los límites de control.
  - Los resultados obtenidos de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de las muestras tomadas durante el enjuague final y escurrido final, de fermentadores y separadoras, de fermentadores y separadoras, cumplen con los criterios de referencia establecidos para estos parámetros durante el tiempo de muestreo, por lo tanto la limpieza CIP ha sido validada.
  - Además de lograr la validación las modificaciones de los protocolos de limpieza CIP implican una mayor eficacia en el proceso con el consiguiente ahorro económico.

Algunas propuestas de mejora que se han planteado viendo los resultados obtenidos son:

- Manteniendo la temperatura de la sosa constante a 70°C durante la limpieza alcalina se conseguiría un mayor ahorro energético.
- Estudiando el sistema de limpieza CIP, se propone realizar el enjuague intermedio de las máquinas separadoras, entre la limpieza de sosa y de ácido nítrico, con agua recuperada, y así conseguir un ahorro de agua de proceso.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Atkins, P., De Paula, J., & Friedman, R. (2013). *Physical Chemistry: Quanta, Matter, and Change*. 2º Ed. Oxford University Press, Reino Unido.

Attfield, P. V., & Kleetsas, S. (2000). Hyperosmotic stress response by strains of bakers' yeasts in high sugar concentration medium. *Letters in applied microbiology*, 31, 323-327.

Cartón, F. L., Iranzo, E. J. O., Navarro, R. B., & Tormo, C. L. (2011). Control de la presencia de biofilms en las industrias alimentarias. *Alimentación, equipos y tecnología*, 264, 43-47.

Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1994). Clean-in-place systems for industrial bioreactors: design, validation and operation. *Journal of industrial microbiology*, 13, 201-207.

Codex Alimentarius (2008). Directrices para la validación de medidas de control de la inocuidad de los alimentos. *CAC/GL*, 69-2008.

Dickinson, J. R., & Schweizer, M. (Eds.) (2004). *Metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. CRC press.

Forsythe, S. J., & Hayes, P. R. (Ed.) (2012). *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP* (2ª edición). Editorial Acribia.

Goode, K. R., Asteriadou, K., Fryer, P. J., Picksley, M., & Robbins, P. T. (2010). Characterising the cleaning mechanisms of yeast and the implications for Cleaning In Place (CIP). *Food and Bioproducts processing*, 88, 365-374.

Hernandez-Lopez, M. J., Prieto, J. A., & Randez-Gil, F. (2003). Osmotolerance and leavening ability in sweet and frozen sweet dough. Comparative analysis between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 84, 125-134.

Ilyina, A. D., Cerda, F. R., Estrada, B. C., Dukhovich, A. F., Gaona, L. J. G., Garza, G. Y., & Rodríguez, M. J. (1998). Sistema bioluminiscente luciferina luciferasa de las luciérnagas Parte 1: propiedades bioquímicas y catalíticas de la enzima luciferasa. *Revista de la Sociedad Química de Mexico*, 42, 99-108.

Lappalainen, J., Loikkanen, S., Karp, M., Sjöberg, A. M., & Wirtanen, G. (2000). Microbial testing methods for detection of residual cleaning agents and disinfectants - prevention of ATP bioluminescence measurement errors in the food industry. *Journal of Food Protection*, 63, 210-215.

Moerman, F., & Leuven, K. U. (2014). Cleaning in place (CIP) in food processing. *Hygiene in Food Processing: Principles and Practice*, 305.

Norma de Seguridad Alimentaria IFS (International Food Standard). Versión 6.

Normas Consolidadas AIB International de Sanidad, Inocuidad y Calidad de Alimentos.

O'Rourke, T. (2003). CIP- cleaning in place. *Brewer International*, 3, 30-4.

Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., & Matallana, E. (2015). Yeast biomass, an optimized product with myriad applications in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 167-175.

Real Decreto 770/1999, de 7 de mayo, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de detergentes y limpiadores (BOE, núm. 118, de 18 de mayo de 1999).

Reed, G. (2012). *Yeast technology* (2ª ed.) Springer Science & Business Media.

Reglamento (CE) N° 648/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, sobre detergentes.

Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Rose, A. H., & Harrison, J. S. (Ed.) (2012). *The yeasts: Yeast technology* (Vol. 5). Elsevier.

Salo, S., Friis, A., & Wirtanen, G. (2008). Cleaning validation of fermentation tanks. *Food and bioproducts processing*, 86, 204-210.

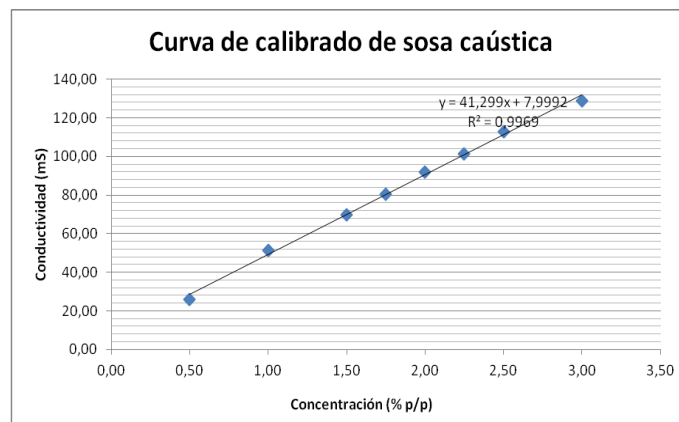
Timmerman, H. (2013). Cleaning validation, practical considerations. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 2, 3-5.



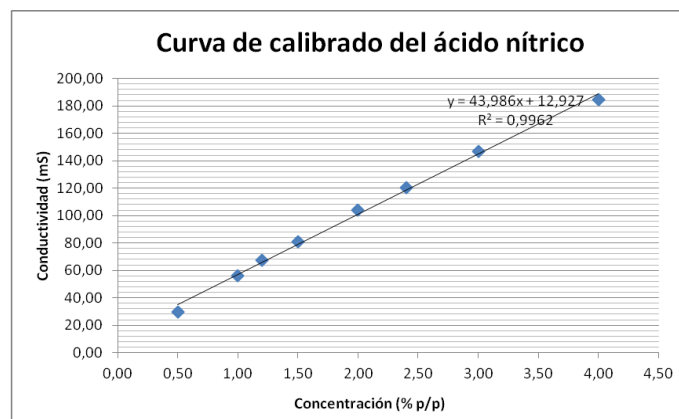
## ANEXO I

### 1. Curvas de calibrado de la conductividad en función de la concentración de las soluciones de limpieza.

Se midió la conductividad en mS a 20°C de soluciones de sosa cáustica y ácido nítrico de concentración conocida (% p/p). Con los resultados obtenidos se construyeron dos gráficos de dispersión, uno para la sosa y otro para el nítrico, y se calculó el coeficiente de correlación entre las dos variables (conductividad y % p/p) y la ecuación de la recta.



**Figura 17:** Curva de calibrado de la conductividad vs concentración de la solución de sosa en la limpieza CIP.



**Figura 18:** Curva de calibrado de la conductividad vs concentración de la solución de ácido nítrico en la limpieza CIP.

En las Figuras 17 y 18 se observa que el coeficiente de correlación se encuentra entre 0,995 y 1,0, lo que indica que hay una fuerte correlación entre ambas variables. De acuerdo a la ecuación de la recta, se calculó que la concentración de la sosa al 1,5% y la concentración del ácido nítrico al 1,3% equivalen a una conductividad de 70 mS.

## ANEXO II

### 2. Árbol de decisiones para la validación del sistema de limpieza CIP.

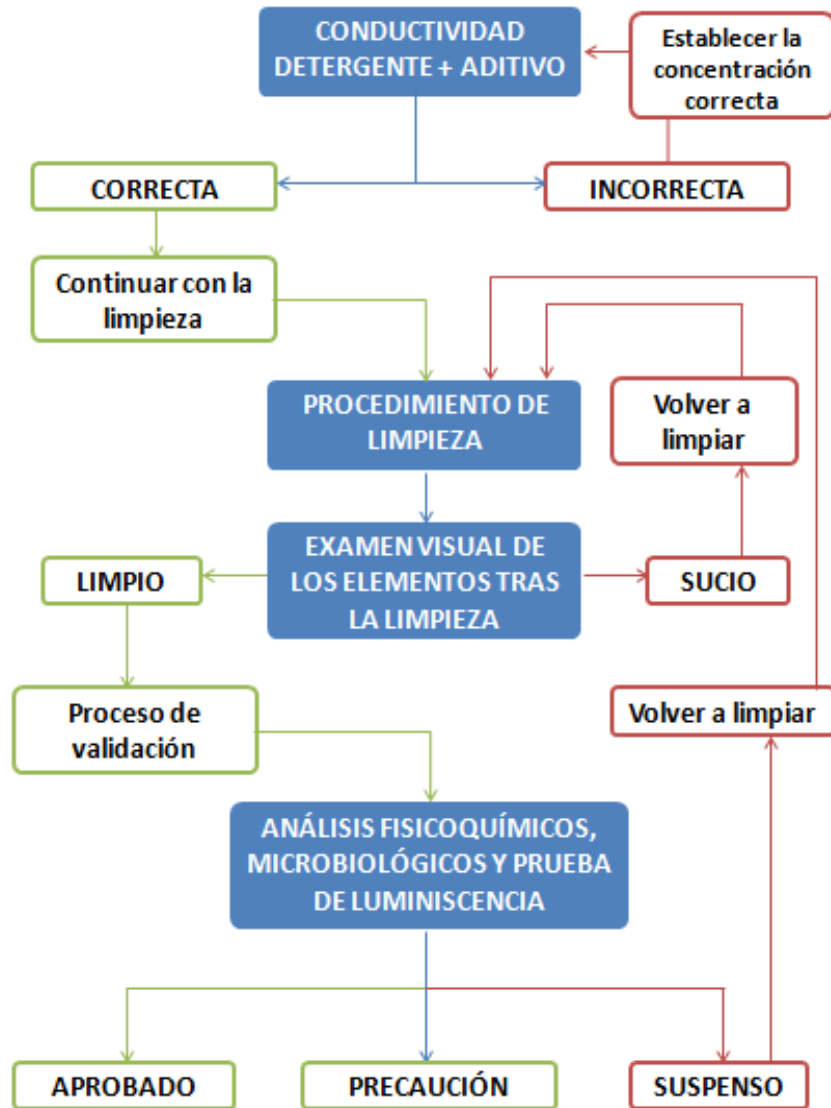


Figura 19: Árbol de decisiones para la validación del sistema de limpieza CIP.