



# **Universidad de Valladolid**

**CAMPUS DE PALENCIA**

**Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias**

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**

## **“Validación de limpieza CIP en instalaciones de una fábrica de producción industrial de levadura”**

**Alumna: María Raquel López Moreira Gorostiaga**

**Tutor académico: Carlos A. Blanco Fuentes**

**Tutor empresa: José María Giralda Sánchez**

**Julio 2014**



## ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT .....	2
2. INTRODUCCIÓN .....	3
2.1. Limpieza en fábrica de producción industrial de levadura.....	3
2.2. Validación de limpieza.....	4
2.2.1. Directrices para la Validación del Codex Alimentarius.....	5
2.3. Limpieza CIP .....	6
2.3.1. Protocolos de limpieza CIP de la planta industrial de levadura.....	9
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
4.1. Materiales y equipos .....	13
4.2. Métodos .....	14
4.2.1. Tareas previas a la validación .....	14
4.2.2. Enfoque de la validación .....	14
4.2.3. Protocolo de validación .....	14
4.2.3.1. Selección de los puntos de muestreo .....	15
4.2.3.2. Control fisicoquímico y microbiológico .....	16
4.2.4. Criterios de decisión.....	18
4.2.5. Análisis estadístico de los resultados .....	19
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
5.1. Control fisicoquímico .....	20
5.1.1. Conductividad de la sosa durante la limpieza alcalina.....	20
5.1.2. Conductividad del ácido nítrico durante la limpieza ácida.....	22
5.1.3. Temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina .....	24
5.1.4. Conductividad y pH de las aguas de enjuague.....	26
5.2. Control microbiológico.....	27
6. CONCLUSIONES .....	28
7. BIBLIOGRAFÍA .....	29

## 1. RESUMEN / ABSTRACT

En la actualidad la validación de las limpiezas se ha convertido en una imperiosa necesidad de la industria alimentaria para garantizar la calidad de sus productos y lograr la comercialización de éstos. El objetivo del presente trabajo fue validar la limpieza de los fermentadores y máquinas centrífugas de separación utilizados en la elaboración industrial de levadura de panificación. Primeramente fue necesario realizar un estudio del sistema de limpieza CIP a fin de identificar todos los elementos involucrados tales como el diseño, etapas de la limpieza, soluciones de limpieza utilizadas y sus parámetros de concentración, temperatura y tiempo de contacto. Se tomaron muestras de las soluciones de limpieza de los puntos de muestreo seleccionados y se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos con el objeto de verificar si los parámetros de la limpieza CIP son capaces de lograr el propósito establecido. De acuerdo al estudio de capacidad de proceso realizado, se comprobó que el proceso de limpieza CIP es *capaz* pero se encuentra *fuera de control* respecto a la temperatura de la sosa cáustica utilizada durante la limpieza. A pesar de la variabilidad de la temperatura de la sosa identificada en el proceso, se obtuvieron excelentes resultados microbiológicos. La calidad microbiológica y fisicoquímica del agua de enjuague fue establecida como criterio de decisión. Se concluyó que el protocolo de limpieza CIP utilizado se encuentra validado ya que los resultados de las muestras analizadas se hallan dentro de las especificaciones implantadas para la validación.

At present, validation of cleaning processes has become an essential need for the food industry to ensure the quality of their products and achieve commercialization of them. The aim of this study was to validate the cleaning processes of fermentation tanks and centrifugal separation machines used in industrial processing of baker's yeast. It was first necessary to carry out a study of the CIP cleaning system to identify all of the elements involved such as design, stages of cleaning, cleaning solutions used and their parameters of concentration, temperature, and contact time. Cleaning solutions samples of selected sampling points were taken for physio-chemical and microbiological analysis to check if cleaning parameters are capable of achieving the stated purpose. According to the process capability study, it was found that the CIP process is *capable* but *cannot control* caustic soda temperature used during the cleaning process. Excellent microbiological results were obtained despite the variability of sodium temperature identified. Microbiological and chemical quality of the rinse water was established as acceptance criteria. It was concluded that the CIP protocol used is validated since analyzed samples results are within specifications for validation.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Limpieza en fábrica de producción industrial de levadura

La primera etapa de la producción industrial de levadura o “producción de levadura madre” consiste en el crecimiento o propagación del cultivo puro de la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en un sustrato de melaza como fuente de carbono, sales minerales y vitaminas. El proceso comienza con fermentaciones tipo *batch* donde los nutrientes se añaden de una sola vez, al principio y se esterilizan antes de la siembra de la levadura. La segunda etapa consiste en fermentaciones tipo *feed batch*, donde la levadura madre producida se siembra en fermentadores con aireación donde los nutrientes se van añadiendo gradualmente. La segunda etapa o “propagación industrial”, tiene como objetivo la multiplicación de la levadura confiriéndole una composición bioquímica y un estado fisiológico según las necesidades del cliente. La levadura producida es concentrada y lavada utilizando un separador centrífugo donde se separa el caldo de cultivo y se obtiene una crema de levadura. Esta es almacenada en depósitos refrigerados (en el caso de levadura líquida a granel) o envasada y almacenada en frío (en el caso de levadura líquida envasada, granulada o prensada), a la espera de ser expedida al cliente.

La pureza microbiológica de la levadura es un parámetro de calidad muy importante por lo que debe ser producida en condiciones de higiene y limpieza rigurosamente controladas. Los fermentadores deben estar microbiológicamente limpios antes de iniciar la fermentación a fin de evitar contaminaciones cruzadas durante el proceso, y deben ser enjuagados completamente para evitar contaminaciones en el producto final (Salo et al., 2008).

Los fermentadores pueden ser de hasta varios cientos de metros cúbicos con una sola bola de pulverización de limpieza montada en la parte superior del depósito. 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. El enorme tamaño y la falta de puntos de muestreo apropiados hacen que el muestreo de superficie por hisopado sea problemático. Por lo tanto la validación del procedimiento de limpieza en procesos cerrados es problemática, ya que el acceso al interior de la instalación resulta muy difícil. Los métodos utilizados para evaluar la eficacia de los protocolos de limpieza y desinfección, se basan en una estimación de la cantidad de células microbianas viables restantes en una superficie después de realizar la limpieza (Verran et. al. 2010).

Existen dos métodos generales de muestreo que se consideran aceptables; muestreo directo de superficies mediante hisopos o muestreo indirecto de superficies mediante el agua de enjuague (FDA, 1993). El análisis de superficie por hisopado es el método más ampliamente utilizado, sin embargo carece de la estandarización necesaria para proporcionar el nivel de reproducibilidad requerida. La validez del hisopado depende de la eficiencia de la persona que lleva a cabo el procedimiento en tres puntos: la eliminación de las bacterias de la superficie, la eliminación de bacterias del hisopo y el cultivo de bacterias (Moore y Griffith, 2007). Además de las propiedades de la superficie (topografía, humectabilidad, porosidad, etc.), la presencia de material orgánico sobre la misma puede también afectar a la eficiencia del hisopado.

En un estudio realizado por Camper y McFeters (2000) se analizaron muestras del agua que circula en un sistema de distribución de agua potable a fin de determinar la presencia de biofilms debido a las limitaciones de acceso a las superficies de muestreo. Sin embargo, concluyeron que no hay métodos aceptables que permitan correlacionar directamente el número de bacterias en el agua que circula en las instalaciones con el número de biofilms en sus superficies.

Es importante ser consciente de las limitaciones de un método dado para evaluar la presencia de microorganismos en una superficie. La mayoría de los métodos están inevitablemente limitados de alguna manera (Verran et. al. 2010).

## **2.2. Validación de limpieza**

El control de los peligros que pueden asociarse a los alimentos supone habitualmente la aplicación de medidas de control. En el entorno actual de controles de inocuidad de los alimentos basados en sistemas que proporcionan flexibilidad respecto a la selección de las medidas de control, la validación de estas medidas adquiere una importancia mayor. (Codex, 2008). Gracias al proceso de validación se puede demostrar que las medidas de control elegidas realmente son capaces de lograr, de una manera constante, el nivel previsto de control del peligro. (Codex, 2008). En los procesos industriales agroalimentarios, la validación es una tarea compleja y requiere de un enfoque multidisciplinario para llegar a un resultado documentado y probado (Timmerman, 2013).

La validación de los protocolos de limpieza se ha convertido en un tema de alta prioridad en las industrias alimentarias ya que permite garantizar resultados consistentes y cumplimiento de los estándares. Se trata de un procedimiento documentado cuyo objetivo es verificar la eficacia del procedimiento de limpieza en la eliminación de residuos de productos, productos de degradación, conservantes y/o agentes de limpieza, así como el control de posibles contaminantes microbianos (Canada, 2008).

La validación requiere el conocimiento de todos los elementos que intervienen en el resultado de la limpieza, tales como diseño y desarrollo de un programa efectivo, selección de los métodos de análisis disponibles, selección de los métodos y puntos de muestreo, selección de los blancos y controles, estrategias adecuadas para los muestreos, herramientas utilizadas para un apropiado seguimiento y verificación y validación, así como también documentaciones y referencias apropiadas. (Timmerman, 2013).

### **2.2.1. Directrices para la Validación del Codex Alimentarius**

Las directrices para la validación de medidas de control del Codex (CAC/GL 69-2008) proporcionan asesoramiento a la industria y a los gobiernos sobre la validación de las distintas medidas de control. Estas directrices presentan información sobre las tareas previas a la validación, el enfoque de la validación, el proceso de la validación y la necesidad de una nueva validación o revalidación.

*Tareas previas a la validación:* antes de que un establecimiento alimentario valide las medidas de control, es importante completar ciertas tareas de manera que la validación pueda lograrse efectiva y eficazmente. Estas tareas incluyen:

- a) La identificación de los peligros que se pretenden controlar en el producto o el entorno en cuestión tomando en cuenta toda la información pertinente, incluida la proporcionada por una evaluación de riesgos si estuviera disponible.
- b) La identificación del resultado requerido en materia de inocuidad de los alimentos.
- c) La identificación de las medidas de control que han de validarse.

*Proceso de validación:* una vez terminadas las tareas previas a la validación, el proceso de la validación de medidas de control incluye las siguientes etapas:

- a) Decidir el enfoque o la combinación de enfoques que se aplicarán.
- b) Definir los parámetros y los criterios de decisión que demostrarán que una medida de control o combinación de medidas de control, si se aplica debidamente, es capaz de controlar constantemente el peligro con un resultado previsto.
- c) Reunir la información pertinente para la validación y, de ser necesario, realizar los estudios.
- d) Analizar los resultados.
- e) Documentar y revisar la validación.

*Enfoque de la validación:* se dispone de una gama de enfoques posibles para la validación. El enfoque preciso dependerá, entre otras cosas, de la naturaleza del peligro, la naturaleza de la materia prima y del producto, el tipo de medidas de control o de sistema de control de inocuidad de los alimentos seleccionado para controlar el peligro, y del rigor previsto de dicho control.

*Necesidad de una revalidación:* ante un fallo del sistema, cambios en el proceso, nueva información científica o reglamentaria, etc., se hace necesario revalidar una medida de control o una combinación de medidas de control, elaborando un procedimiento claro y eficaz.

### **2.3. Limpieza CIP**

Los sistemas de limpieza in situ (CIP, del inglés: “cleaning in place”) resultan idóneos en aquellos sectores en los que la higiene constituye un aspecto de importancia primordial y la contaminación debe evitarse a toda costa. La limpieza CIP es un proceso automático utilizado en plantas industriales para devolver sus instalaciones al estado limpio luego de terminar un ciclo productivo (Tamime, 2008). Los depósitos, tuberías y líneas de proceso completas pueden limpiarse sin necesidad de desmontar ningún equipo. Consiste en recircular la solución de limpieza a través de los componentes de la línea de proceso como tuberías, intercambiadores de calor, bombas, válvulas, etc. bajo condiciones apropiadas de tiempo, temperatura, concentración y acción mecánica (Ryther, 2014). El sistema debe asegurar un flujo turbulento a fin de otorgar una acción mecánica o “fregado mecánico” a las soluciones de limpieza, permitiendo la remoción de la suciedad. La circulación turbulenta asegura la efectividad de la limpieza sólo si presenta el llamado número de Reynolds en una franja de valores. En este indicador se consideran la densidad y la viscosidad del líquido, la velocidad media de circulación y el diámetro de la cañería (Alfa Laval, 2002).

La solución de limpieza puede ser un cáustico o un ácido, dependiendo de la naturaleza química de la suciedad a remover. Las soluciones alcalinas actúan disolviendo proteínas, grasas y azúcares favoreciendo la eliminación de suciedad de tipo orgánico. Las soluciones ácidas actúan como desincrustantes favoreciendo la eliminación de los residuos calcáreos (Berk, 2013).

El régimen de limpieza CIP típicamente utilizado en fermentadores consiste en un pre-enjuague, limpieza alcalina, enjuague intermedio, esterilización y enjuague final (O'Rourke, 2003). El pre-enjuague permite remover gran cantidad de residuos de poca adherencia, la limpieza alcalina permite disolver y eliminar el material restante y los microorganismos, el enjuague intermedio permite remover los restos del detergente, la desinfección permite eliminar la población microbiana restante y el enjuague final permite eliminar completamente los restos del desinfectante utilizado. La velocidad de flujo aplicada debe ser de al menos  $1,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ . En una secuencia CIP, las fases de pre-enjuague y limpieza química tienen mayor impacto en la remoción de la mayor cantidad de residuos (Goode et al., 2010).

La planta industrial donde se realizó el presente estudio cuenta con una Central CIP de alto grado de automatización ya que almacena, prepara, distribuye, controla y ajusta la concentración y temperatura de las soluciones de limpieza. Cuenta con depósitos de sosa cáustica al 1,6% (en adelante sosa), ácido nítrico al 1,3% (en adelante ácido) y agua recuperada, cada uno posee una válvula para toma de muestra, indicador de nivel, medidor de conductividad y en el caso del depósito de sosa, medidor y controlador de temperatura. Todo el sistema es cerrado a fin de recuperar las soluciones empleadas en la limpieza. Las soluciones de limpieza son bombeadas desde los depósitos de la Central CIP a través del *circuito de envío* a las instalaciones a ser higienizadas, retornando nuevamente a los depósitos a través del *circuito de retorno*.

La eliminación de todas las "zonas muertas" donde la solución de limpieza no puede fluir adecuadamente es un factor crítico en el éxito de la limpieza CIP de los circuitos de línea, ya que los residuos pueden acumularse dando lugar a una contaminación microbiana (Ryther, 2014). Las tuberías deben estar libres de espacios muertos tanto como sea posible, y si es inevitable, la profundidad de la zona muerta debe ser mínima para asegurar una limpieza adecuada mediante el sistema CIP (Christi y Moo-Young, 1994). Esto resulta especialmente importante en los asientos de válvulas de purgas ubicadas a lo largo del circuito. Es por ello que el sistema CIP de la planta industrial realiza la apertura de todas las válvulas de purga del circuito durante pocos segundos



al final de la recirculación de cada solución de limpieza. El paso de las soluciones a través de ellas permite arrastrar toda la suciedad acumulada asegurando la efectividad de la limpieza. Este proceso se conoce técnicamente como *flip-flop*.

### 2.3.1. Monitoreo de la limpieza CIP mediante mediciones de conductividad

La conductividad es una de las medidas más utilizadas en los análisis de procesos ya que permite controlar o regular las operaciones donde bases y ácidos desempeñan una función. La conductividad electrolítica es una medida de la capacidad de una solución acuosa de conducir la corriente eléctrica. La conductividad de la solución de limpieza varía con su concentración química, en soluciones acuosas la conductividad es directamente proporcional a la concentración de sólidos disueltos, por lo tanto cuanto mayor sea dicha concentración, mayor será la conductividad. Las soluciones diluidas siguen la ley de Kohlrausch de la dependencia de la concentración según la ecuación:

$$\Lambda = \Lambda^\infty - K c^{1/2}$$

donde  $\Lambda$  es la conductividad molar,  $\Lambda^\infty$  la conductividad molar límite, K es una constante empírica y c es la concentración de electrolito (Atkins et. al. 2013). La medición de la conductividad es una manera simple de monitorear cada fase del proceso CIP ya que permite controlar y registrar la concentración de las soluciones de limpieza utilizadas y así validar la conformidad respecto a los parámetros establecidos. La conductividad también indica cuando se ha completado el enjuague entre pasos de limpieza ya que ésta desciende al nivel de la conductividad del agua de enjuague, lo que permite activar la siguiente etapa o finalizar el ciclo de limpieza.

El sistema CIP de la planta industrial dispone de un medidor de conductividad en el *circuito de retorno* el cual permite controlar la conductividad de las soluciones utilizadas en cada etapa tal como se expone en la Tabla 1:

**Tabla 1. Conductividad en el circuito de retorno.**

Etapa	Valor prefijado de conductividad ¿OK?	
Antes de la recirculación de la solución de limpieza (sosa o ácido)	<b>SI:</b> Recuperación de la solución de limpieza en cada depósito (sosa o ácido)	<b>NO:</b> Recuperación del agua con restos de solución en depósito de agua recuperada
Durante la recirculación de la solución de limpieza (sosa o ácido)		
Después de la recirculación de la solución de limpieza (sosa o ácido)		
Antes de la recirculación del agua de enjuague intermedio o final		

De esta manera es posible recuperar las soluciones de limpieza durante el CIP asegurando la consigna o parámetro de concentración durante el tiempo de circulación establecido.

### 2.3.1. Protocolos de limpieza CIP de la planta industrial de levadura

**Fermentadores:** Cada fermentador cuenta con un cabezal de limpieza rotativo en la parte superior, estos poseen rodamientos hidrodinámicos que permiten que el dispositivo gire con la propia presión de la solución de limpieza de manera que todo el líquido disponible se proyecta a través de dos toberas de chorro. La gran ventaja de estos dispositivos es una limpieza más eficiente con mayor presión y menor caudal eliminando cualquier tipo de suciedad. La presión de trabajo es de 11 bar lo que permite un amplio diámetro de alcance. La limpieza CIP de los fermentadores se realiza sólo con sosa durante la semana, siendo con sosa y ácido al final de la semana (en el presente trabajo se validó sólo la limpieza con sosa). El CIP de los fermentadores cuenta con dos bombas de limpieza (Figura 1):

1. Bomba de alta presión (en adelante AP) y bajo caudal: La elevada presión de la bomba AP permite girar el cabezal de limpieza cuya función es limpiar toda la superficie interna del fermentador.
2. Bomba de baja presión (en adelante BP) y alto caudal: El alto caudal de la bomba BP permite que la solución de limpieza ingrese rápidamente al fermentador a través de la parrilla de aireación, limpiando ésta a su paso e inundando el fondo.

Las partes del fermentador y el diseño del sistema CIP se muestra en la Figura 1.

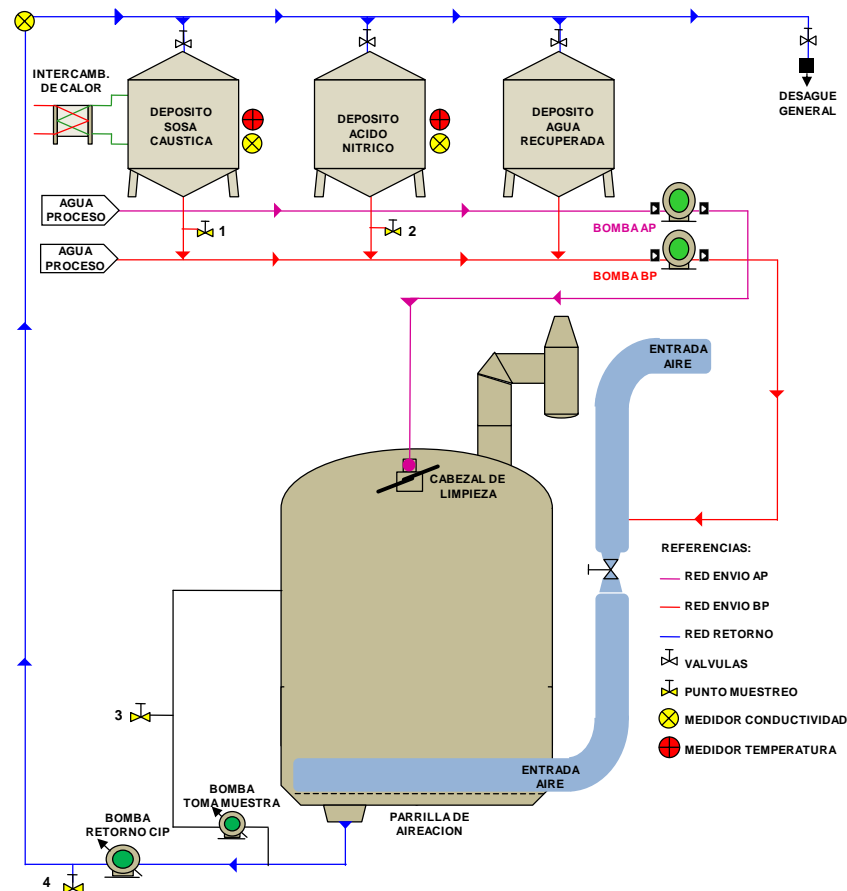


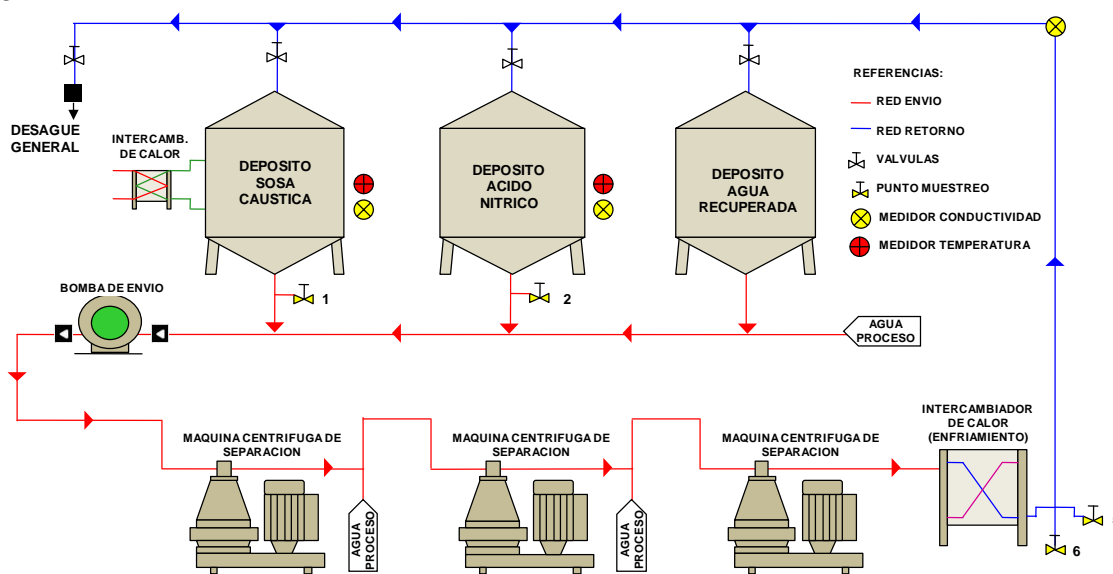
Figura 1: Diagrama de limpieza CIP de los fermentadores.

La limpieza CIP de los fermentadores se realiza automáticamente a través de un Controlador Lógico Programable cuyas etapas se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Etapas de limpieza CIP de los fermentadores.**

Etapa	Descripción	Parámetro o Consigna
Pre-enjuague	Se realiza con <b>agua recuperada</b> durante el tiempo establecido. Luego se vacían los restos de agua acumulados en el fermentador por las tuberías al desagüe general.	Tiempo: 120 s bomba BP Tiempo: 180 s bomba AP Temperatura: ambiente
Enjuague	Se realiza con <b>agua recuperada</b> durante el tiempo establecido. Luego se vacían los restos de agua acumulados en el fermentador por las tuberías al desagüe general.	Tiempo: 2 min bomba BP Tiempo: 5 min bomba AP Temperatura: ambiente
Limpieza alcalina	Primeramente se realiza un empuje con <b>sosa</b> hasta el desagüe general, previo paso por medidor de conductividad. Cuando éste detecta consigna de conductividad se abre la válvula de entrada del depósito de sosa y se cierra la válvula de desagüe general. A partir de allí recircula la solución durante el tiempo establecido.	Tiempo: 40 min Temperatura: 80°C Concentración sosa: 1,6%
Enjuague final	Primeramente se realiza un empuje con <b>agua de proceso</b> hasta el depósito de sosa, previo paso por medidor de conductividad. Cuando éste detecta consigna de conductividad se abre la válvula de entrada del depósito de agua recuperada y se cierra la válvula del depósito de sosa. A partir de allí recircula el agua de proceso durante el tiempo establecido.	Tiempo: 5 min Temperatura: ambiente
Escurrido	Se abren todas las purgas para eliminar los restos de agua acumulados en todo el circuito.	Tiempo: 300 s Temperatura: ambiente

**Sistema de separación:** La limpieza CIP permite limpiar todas las instalaciones que forman parte del sistema de separación (o separadoras) lo cual incluye máquinas centrífugas, intercambiador de calor, bombas, válvulas y tuberías asociadas al sistema (Figura 2). A diferencia de los fermentadores, la limpieza de las separadoras presenta una etapa adicional de limpieza ácida la cual se realiza diariamente. En este caso, el enjuague final se realiza con una mezcla variable de agua de proceso y agua osmotizada. El sistema de separación y el diseño del sistema CIP se muestra en la Figura 2.



**Figura 2: Diagrama de limpieza CIP del sistema de separación.**

La limpieza CIP del sistema de separación se realiza automáticamente a través de un Controlador Lógico Programable cuyas etapas se presentan en la Tabla 3:

**Tabla 3. Etapas de limpieza CIP del sistema de separación.**

Etapa	Descripción	Parámetro
<b>Enjuague</b>	Se realiza con <b>agua</b> durante el tiempo establecido. Luego se vacían los restos de agua acumulados por las tuberías al desagüe general.	Tiempo: 5 min Temperatura: ambiente
<b>Limpieza alcalina</b>	Se realiza con <b>sosa</b> la cual recircula por el circuito descrito durante el tiempo establecido (*).	Tiempo: 30 min Temperatura: 80°C Concentración sosa: 1,6%
<b>Enjuague intermedio</b>	Se realiza con <b>agua de proceso</b> la cual recircula por el circuito descrito durante el tiempo establecido a fin de eliminar los restos de sosa (*).	Tiempo: 5 min Temperatura: ambiente
<b>Limpieza ácida</b>	Se realiza con <b>ácido</b> el cual recircula por el circuito descrito durante el tiempo establecido (*).	Tiempo: 15 min Temperatura: ambiente Concentración ácido: 1,3%
<b>Enjuague final</b>	Se realiza con <b>agua de proceso y agua osmotizada</b> durante el tiempo establecido a fin de eliminar los restos de ácido (*).	Tiempo: 5 min Temperatura: ambiente
<b>Escurrido</b>	Se abren todas las purgas para eliminar los restos de agua acumulados en todo el circuito.	Tiempo: 300 s Temperatura: ambiente

Observaciones respecto a lo descrito en la Tabla 2 y 3:

- a) (\*) El medidor de conductividad instalado en la red de retorno del CIP del sistema de separación realiza las mismas discriminaciones detalladas en la Tabla 2 (fermentadores) en cada etapa de limpieza.
- b) Después de cumplir el tiempo prefijado para cada etapa (enjuagues y limpieza alcalina y/o ácida) se realizan los *flip-flops*.
- c) Cuando no hay disponibilidad de agua recuperada se utiliza agua de proceso.
- d) El sistema CIP asegura flujo turbulento a lo largo en las tuberías.

### 3. OBJETIVOS

Una vez definido el contexto en el que se desarrolla el Trabajo de Fin de Máster y la necesidad de realizar y documentar la validación de los protocolos de limpieza CIP, se estableció como objetivo principal de este trabajo: “*Validar los protocolos de limpieza CIP de los fermentadores y del sistema de separación de una fábrica de producción industrial levadura de panadería*”.

Para lograr el objetivo principal se desarrolló un protocolo de validación de limpieza CIP de los fermentadores y separadoras, el cual constituyó la herramienta fundamental del trabajo. Para ello se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Identificar los peligros y las medidas de control que se pretenden validar.
- Definir el enfoque de validación de las medidas de control.
- Establecer los criterios de decisión.
- Reunir la información pertinente para la validación y realizar los estudios.

Para lograr los objetivos establecidos se trabajó en el área de fermentación y el laboratorio de control de la planta industrial de levadura.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales y equipos

#### a) Análisis fisicoquímicos

Materiales y equipos utilizados:

- Conductímetro *Crison*, modelo Micro CM 2202.
- pH-metro *Crison*, modelo Basic 20.
- Baño de agua con regulador de temperatura *Selecta*, modelo Precistern.
- Termómetro de alcohol de escala 10 a 110°C (precisión: 0,1°C).
- Frascos de plástico con tapa de 250 ml para toma de muestras.
- Material de vidrio general (pipetas, matraces, vasos de precipitados, etc.).

Reactivos utilizados:

- Ácido nítrico 69% para análisis *Merck Millipore*
- Solución de hidróxido de sodio 1N *Merck Millipore*

#### b) Análisis microbiológicos

Materiales y equipos utilizados:

- Campana de flujo laminar *Gelair TCA 48*.
- Estufa de cultivo *Memmert IN 110*.
- Placas de Petri estériles
- Pipetas graduadas estériles
- Mechero de Bunsen
- Frascos estériles de 100 ml para toma de muestras.

Medios de cultivos y reactivos utilizados en análisis microbiológico:

- Agar PCA (Plate Count Agar), *Pronadisa*.
- Agar Violeta Rojo Bilis, *Pronadisa*.
- Agar VRB-MUG Fluorocult, *Merck Millipore*.
- Agar YGC, *Sigma-Aldrich*.
- Tabletas de tiosulfato de sodio, *Oxoid*.
- Nystatina en polvo, *Sigma-Aldrich*.

## **4.2. Métodos**

Se utilizó como referencia y se siguió al detalle 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). Se consideraron también las directrices para la validación de limpieza de la FDA (FDA, 1993) y la reglamentación sanitaria de Canadá (Canada, 2008).

### **4.2.1. Tareas previas a la validación**

Se identificaron *peligros biológicos* debido a proliferación microbiana por equipos deficientemente limpios y *peligros químicos* debido a restos de productos de limpieza en los equipos. El resultado requerido en materia de inocuidad de alimentos es el saneamiento eficaz de las superficies que entran en contacto con los alimentos, demostrado mediante el cumplimiento de criterios microbiológicos y fisicoquímicos. Para ello se identificaron los protocolos de limpieza CIP como medidas de control de los peligros los cuales fueron sometidos a validación.

### **4.2.2. Enfoque de la validación**

La validación está enfocada en la obtención de datos científicos durante condiciones normales de limpieza CIP de los fermentadores y las separadoras. Para ello se realizaron una serie de toma de muestras y análisis de las soluciones de limpieza y aguas de enjuague utilizadas en el CIP.

### **4.2.3. Protocolo de validación**

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

- Soluciones de limpieza utilizadas y sus parámetros de concentración, temperatura, tiempo de contacto y caudal necesario para lograr el efecto mecánico.
- Etapas de la limpieza CIP, es decir enjuague, limpieza alcalina, limpieza ácida, etc.
- Estudio del sistema CIP teniendo en cuenta depósitos, tuberías y bombas para llevar a cabo la limpieza.

Una vez identificados y estudiados todos los puntos mencionados se desarrolló un protocolo de validación en cual se describió paso a paso el proceso de validación. Se ejecutó el protocolo de validación durante 4 semanas de producción a escala real a fin de obtener resultados de 15 limpiezas.

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

- Todos los equipos son exactamente iguales en diseño, material de construcción, tuberías, válvulas y bombas asociadas.
- Todos los equipos son sometidos al mismo tipo de limpieza CIP según lo establecido en el protocolo de limpieza.
- Todas las limpiezas están automatizadas y se encuentran vigiladas bajo el mismo Controlador Lógico Programable.
- Todos los equipos se encuentran asociados a la misma Central CIP, es decir todos utilizan la misma solución de limpieza.

Cabe mencionar que la limpieza CIP de los fermentadores y separadoras siempre se realiza al mismo tiempo y a partir de los mismos depósitos de sosa y ácido de la Central CIP.

#### **4.2.3.1. Selección de los puntos de muestreo**

Se identificaron los puntos de muestreo existentes y otros puntos donde se pudieron tomar muestras siempre que éstos: a) sean representativos del objetivo buscado y b) que no supongan un riesgo laboral para la persona que realice los muestreos.

Los puntos de muestreo seleccionados en los fermentadores se enumeraron en la Figura 1. A continuación se justifica la elección de cada uno:

- Puntos de muestreo 1 y 2: Los depósitos de la Central CIP presentan tomas de muestra. Tomando muestras de ellas es posible obtener información de las condiciones de concentración y temperatura de la sosa y ácido en cualquier momento durante las etapas de la limpieza CIP.
- Punto de muestreo 3: El fermentador posee una toma de muestra la cual permite tomar muestras microbiológicamente seguras en cualquier momento.
- Punto de muestreo 4: A partir de la válvula de purga del fermentador se puede tomar agua de enjuague en el escurrido final. El escurrido final constituye la última etapa de la limpieza antes de iniciar el proceso productivo, es decir que el agua que circula en la instalación durante esta etapa es lo último que entra en contacto con las superficies antes de iniciar la fermentación.



Los puntos de muestreo seleccionados en el sistema de separación se encuentran enumerados en la Figura 2. A continuación se justifica la elección de cada uno:

- Puntos de muestreo 1 y 2: coinciden con los detallados en los fermentadores.
- Punto de muestreo 5: El intercambiador de calor posee una toma de muestra la cual permite tomar muestras microbiológicamente seguras en cualquier momento de las etapas del CIP. Tomando muestras de allí es posible obtener información de la limpieza del sistema de separación en su conjunto, incluyendo tuberías, máquinas centrífugas, intercambiador de calor y válvulas.
- Punto de muestreo 6: A partir de la válvula de purga de las separadoras se puede tomar agua de enjuague en el escurrido final.

Como se mencionó anteriormente, el sistema CIP de las instalaciones sometidas a ensayo constituye un sistema cerrado por lo que no fue posible el acceso a puntos de muestreo para análisis microbiológico de superficie mediante hisopos.

#### **4.2.3.2. Control fisicoquímico y microbiológico**

Según se detalla en las directrices para la validación de limpiezas de Canadá, se debe realizar una verificación de los parámetros de limpieza a fin de asegurar que ésta se encuentra validada de acuerdo a dichos parámetros (Canada, 2008). De esta manera, una vez identificados los puntos de muestreo, se determinaron los análisis a realizar. Durante el CIP se tomaron muestras de sosa, ácido y agua de enjuague para reunir los datos necesarios a fin de verificar si los parámetros del CIP son capaces de lograr el propósito establecido.

Se realizaron los siguientes análisis fisicoquímicos:

- a) Conductividad y temperatura de sosa y ácido de los depósitos de la Central CIP antes de iniciar y tras finalizar la limpieza alcalina y ácida.
- b) Conductividad y temperatura de la sosa y el ácido que circula en los fermentadores y separadoras durante la limpieza alcalina y ácida.
- c) Conductividad y pH del agua que recircula en los fermentadores y separadoras durante la etapa de enjuague final y escurrido final.

Se realizaron pruebas microbiológicas del agua correspondiente al enjuague final y escurrido final. Se determinaron gérmenes totales, coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia Coli* y levaduras mediante técnica de recuento en placa por siembra en masa. Se utilizó solución de tiosulfato de sodio para inactivar el cloro libre del agua de enjuague. En la Tabla 4 se resumen los controles realizados:

Tabla 4. Controles fisicoquímicos y microbiológicos de la limpieza CIP.

FERMENTADORES			
Muestra	Determinación analítica	Momento de muestreo	Punto de muestreo
Sosa cáustica 1,6%	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	Antes de iniciar la limpieza con sosa (00:00)*	1
	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	A los 5±1 min de limpieza con sosa (00:05)	3
	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	A los 35±1 min de limpieza con sosa (00:35)	3
	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	Al finalizar la limpieza con sosa (00:40)	1
Agua de enjuague	Conductividad (mS), pH y análisis microbiológico	A los 3±1 min del enjuague final (00:03)	3
Agua de enjuague	Conductividad (mS), pH y análisis microbiológico	Durante el escurrido final	4
SISTEMA DE SEPARACIÓN			
Muestra	Determinación analítica	Momento de muestreo	Punto de muestreo
Sosa cáustica 1,6%	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	Antes de iniciar la limpieza con sosa (00:00)	1
	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	A los 5±1 min de limpieza con sosa (00:05)	5
	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	A los 25±1 min de limpieza con sosa (00:25)	5
	Conductividad (mS) y Temperatura (°C)	Al finalizar la limpieza con sosa (00:40)	1
Ácido nítrico 1,3%	Conductividad (mS)	Antes de iniciar limpieza con ácido (00:00)	2
	Conductividad (mS)	A los 7 min de limpieza con ácido (00:07)	5
	Conductividad (mS)	Al finalizar la limpieza con ácido (00:15)	2
Agua de enjuague	Conductividad (mS), pH y análisis microbiológico	A los 3±1 min del enjuague final (00:03)	5
Agua de enjuague	Conductividad (mS), pH y análisis microbiológico	Durante el escurrido final	6

(\*) Observación: nomenclatura hora minuto hh:mm, el tiempo total establecido para cada etapa se detalla en la Tabla 2 y 3.

En el caso del análisis de agua se tomaron muestras durante el enjuague final y el escurrido final. El análisis de agua durante el enjuague final se realizó a modo de control. El análisis del agua del escurrido final permitió determinar si el aclarado es eficaz en la remoción de los agentes de limpieza, ya que es lo último que entra en contacto con las superficies antes de la iniciar el ciclo productivo.

#### 4.2.3.2.1. Verificación de relación lineal de la conductividad en función de la concentración de las soluciones de limpieza.

Se prepararon soluciones de sosa y ácido de concentración conocida (% p/p) y se midió la conductividad (mS) a 20°C. A partir de los resultados obtenidos se realizó un gráfico de dispersión, se calculó el coeficiente de correlación entre las dos variables y la ecuación de recta.

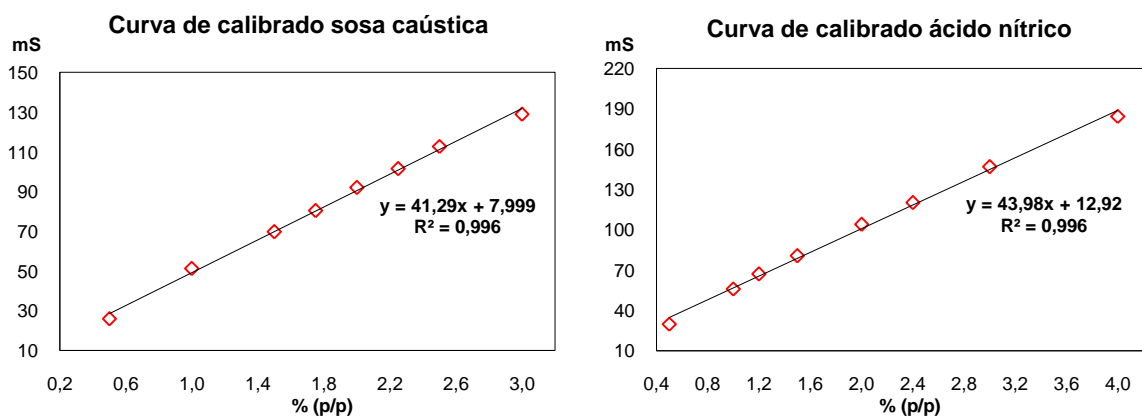


Figura 3: Curva de calibrado de la conductividad eléctrica vs concentración de las soluciones de limpieza utilizadas en el CIP.

Tal como se observa en la Figura 3, en ambos casos el coeficiente de correlación se encuentra entre 0.995 y 1.0, lo que indica que ambas variables se encuentran fuertemente correlacionadas. A partir de la ecuación de la recta se comprobó que: a) el parámetro de concentración de la sosa (1,6%) equivale a una conductividad de 73 mS y b) el parámetro de concentración del ácido (1,3%) equivale a una conductividad de 70 mS.

#### 4.2.4. Criterios de decisión

El protocolo de limpieza CIP se consideró validado si después de la limpieza, las instalaciones (fermentadores y sistema de separación) que entran en contacto con el producto cumplen con los criterios establecidos en la Tabla 5:

**Tabla 5. Criterios de decisión de la validación.**

Indicadores Microbiológicos	Muestra	Valor
Gérmenes totales	Agua de enjuague y escurrido final	< 10 Ufc/ml
Coliformes totales	Agua de enjuague y escurrido final	Ausencia
Coliformes fecales	Agua de enjuague y escurrido final	Ausencia
<i>Escherichia Coli</i>	Agua de enjuague y escurrido final	Ausencia
Levaduras	Agua de enjuague y escurrido final	< 10 Ufc/ml
Indicadores Fisicoquímicos	Muestra	Valor
Conductividad a 20°C	Agua de escurrido final	< 3,5 mS
pH	Agua de escurrido final	6,5 – 9,5

La conductividad y el pH del agua de enjuague del escurrido final se establecieron como criterios de decisión a fin de evaluar la efectividad del aclarado final en la eliminación de los agentes de limpieza.

Al momento de establecer los valores de decisión de conductividad y pH se tuvo en cuenta conductividad del agua del proceso utilizada en la limpieza así como también la reglamentación higiénica sanitaria del agua de consumo humano (Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano).

El agua de proceso y el agua osmotizada utilizada en la fábrica presentan conductividades de 3 a 4 mS y 0,09 a 0,15 mS respectivamente. El pH de ambas oscila entre 7,5 y 8,5.

#### 4.2.5. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa informático *Statgraphics Centurion XVI.II*.

Los resultados de conductividad y temperatura de las soluciones de limpieza (sosa y ácido) fueron representados en gráficos de cajas y bigotes respecto al tiempo de muestreo con el fin de visualizar de forma general las características del conjunto de datos, tales como la dispersión y simetría. A partir de allí se realizó un análisis de comparación de medias y desviaciones estándar.

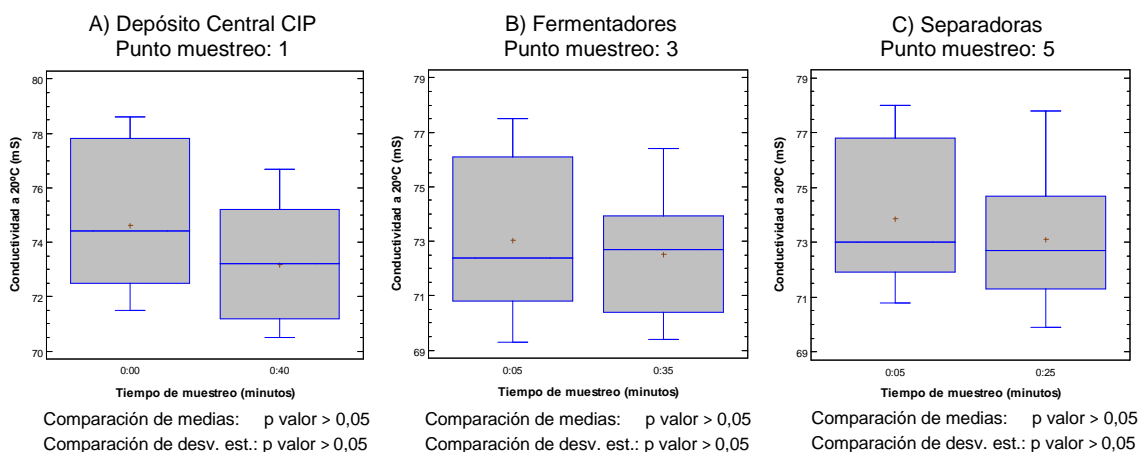
Para determinar la variabilidad del proceso y contrastar con los parámetros establecidos se realizó un análisis de capacidad de proceso. Para ello se calcularon los índices de Cp y Cpk. El índice de Cp relaciona la variabilidad del proceso de acuerdo a los límites de especificación establecidos y la condición para considerar que un proceso es capaz es que el valor del Cp sea mayor a igual a 1,33. El índice de Cpk es utilizado para determinar si el proceso se ajusta a las tolerancias, es decir, si la media del proceso se encuentra centrada o no con relación al valor nominal del mismo. La magnitud de Cpk respecto Cp es una medida directa de que tan apartado del centro está operando el proceso; cuando el valor de Cpk es igual al Cp, el proceso está centrado en el parámetro establecido, y cuando el Cp es mayor que el Cpk el proceso está descentrado (Vilar Barrio, 2005).

Los resultados de conductividad, pH y análisis microbiológico de las aguas de enjuague fueron analizados y comparados respecto a los criterios de aceptación de la validación.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Control fisicoquímico

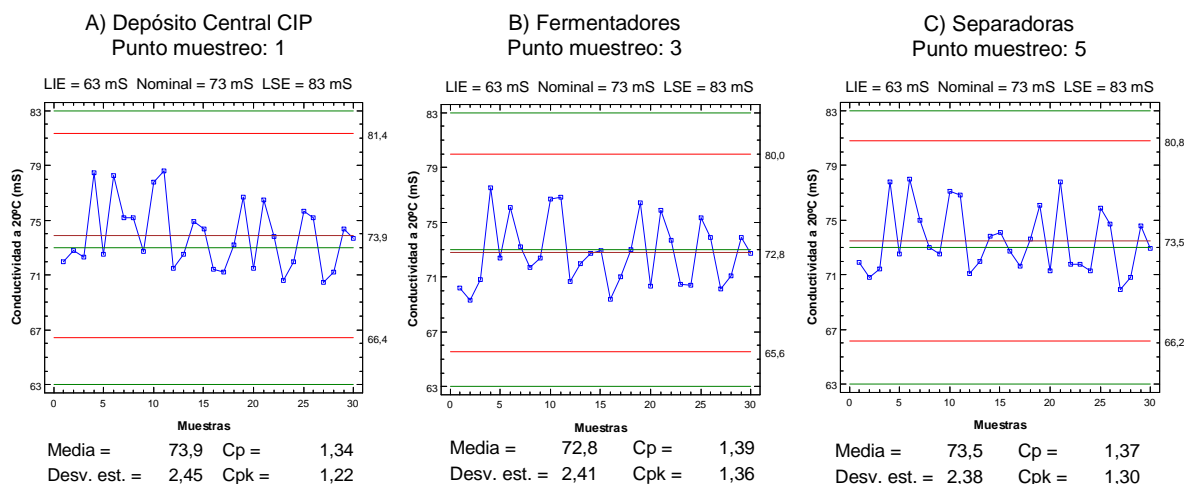
#### 5.1.1. Conductividad de la sosa durante la limpieza alcalina



**Figura 4: Gráficos de cajas y bigotes de conductividad de sosa durante la limpieza alcalina**

En la Figura 4 se observa el gráfico de cajas y bigotes en el cual cada caja representa el 50% de los datos, la línea azul indica la mediana y la cruz roja la media. A su vez, los bigotes representan el 25% de los datos y su longitud indica que tan dispersos se encuentran. En la mayoría de los casos se observa que la mediana no se encuentra ubicada en la mitad de las cajas, lo que indica una asimetría en la distribución de datos.

En cada gráfica la caja de la derecha se encuentra ligeramente por debajo de la caja de la izquierda, lo cual resulta lógico considerando que la sosa se va consumiendo a medida que es utilizada en el CIP y la conductividad desciende. Sin embargo, el p-valor correspondiente al análisis de comparación de medias es superior a 0.05 en todos los casos, por lo que podemos decir que no existe diferencia significativa entre las medias de la conductividad de sosa al inicio de la limpieza (tiempo 0:00 min) y tras finalizar misma (tiempo 0:40 min). Lo mismo ocurre respecto al análisis de comparación de desviaciones estándar. De esta manera podemos decir que la conductividad de la sosa se mantiene estable a lo largo de la limpieza.



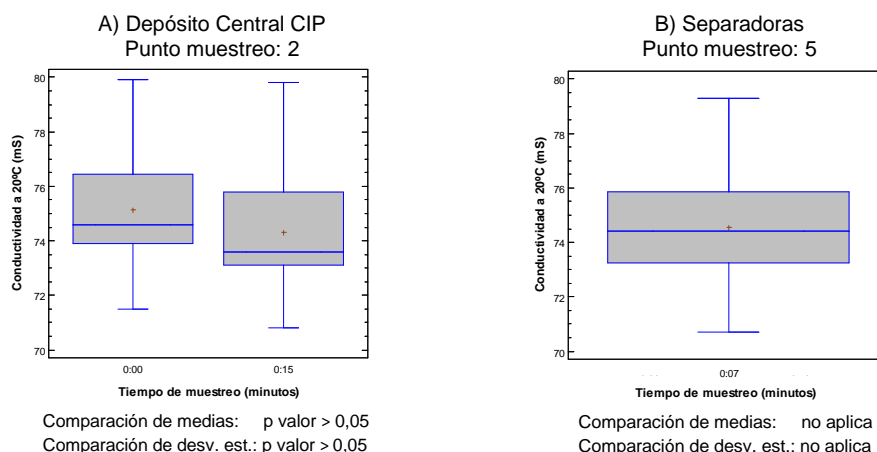
**Figura 5: Gráficas de control de conductividad de sosa durante la limpieza alcalina.**

En la Figura 5 se observa que los valores de conductividad de sosa oscilan a lo largo de la línea central o parámetro (línea verde, valor nominal 73mS). En los tres casos, las gráficas presentan la misma tendencia ya que la sosa utilizada en la limpieza de los fermentadores y separadoras es la misma, es decir parte de los depósitos de la Central CIP (punto de muestreo 1), atraviesa los fermentadores (punto de muestreo 3), separadoras (punto de muestreo 5) y retorna al depósito (punto de muestreo 1). En las gráficas también se observan picos, esto se debe a que la conductividad va bajando a medida que la sosa es utilizada en las limpiezas y cuando el sistema CIP detecta valores por debajo del parámetro (valor nominal 73mS), automáticamente realiza inyecciones de sosa concentrada a fin de mantener la sosa del depósito en la conductividad parámetro. Esto ocasiona que la conductividad suba rápidamente formándose picos en las gráficas.

El sistema CIP es capaz de realizar limpiezas de los fermentadores, separadoras y otras instalaciones de la fábrica al mismo tiempo utilizando la sosa del mismo depósito. Cuanto mayor sea la cantidad de limpiezas alcalinas que se estén realizando, mayor será el descenso de la conductividad de la sosa y se observarán mayor cantidad de picos en las gráficas de control.

A pesar de observarse variabilidad en la conductividad de la sosa debido a lo mencionado anteriormente, podemos decir que el proceso es capaz ( $C_p > 1,33$ ) y que opera dentro de los límites de control (línea roja) y de especificación (línea verde). A su vez podemos decir que el proceso se encuentra centrado en el parámetro establecido ya que el valor del  $C_{pk}$  es prácticamente igual al  $C_p$  en todos los casos.

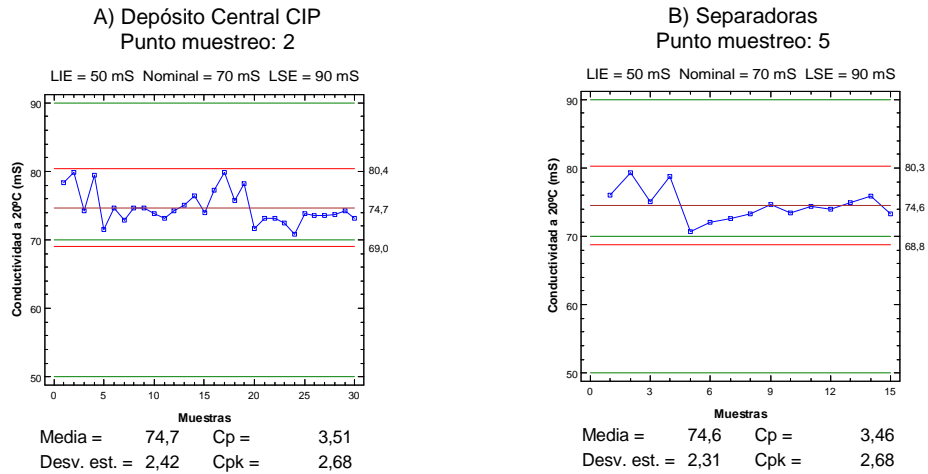
### 5.1.2. Conductividad del ácido nítrico durante la limpieza ácida



**Figura 6: Gráfico de cajas y bigotes de conductividad del ácido durante la limpieza ácida**

En la Figura 6A se observa que los valores de conductividad del ácido en los depósitos de la Central CIP descienden ligeramente a los 15 minutos, lo cual resulta lógico considerando que el ácido se va consumiendo a medida que es utilizado en el CIP. Sin embargo, el p-valor correspondiente al análisis de comparación de medias es superior a 0.05, por lo que podemos decir que no existe diferencia significativa entre las medias de la conductividad del ácido nítrico al inicio de la limpieza ácida (tiempo 0:00 min) y tras finalizar misma (tiempo 0:15 min). Lo mismo ocurre con el análisis de comparación de desviaciones estándar.

En la Figura 6B se observan los valores de conductividad del ácido durante la limpieza de las separadoras, en este caso la distribución de datos es simétrica, ya que la mediana y la media se encuentran centradas en la mitad de la caja y la longitud de los bigotes es prácticamente la misma a ambos lados.

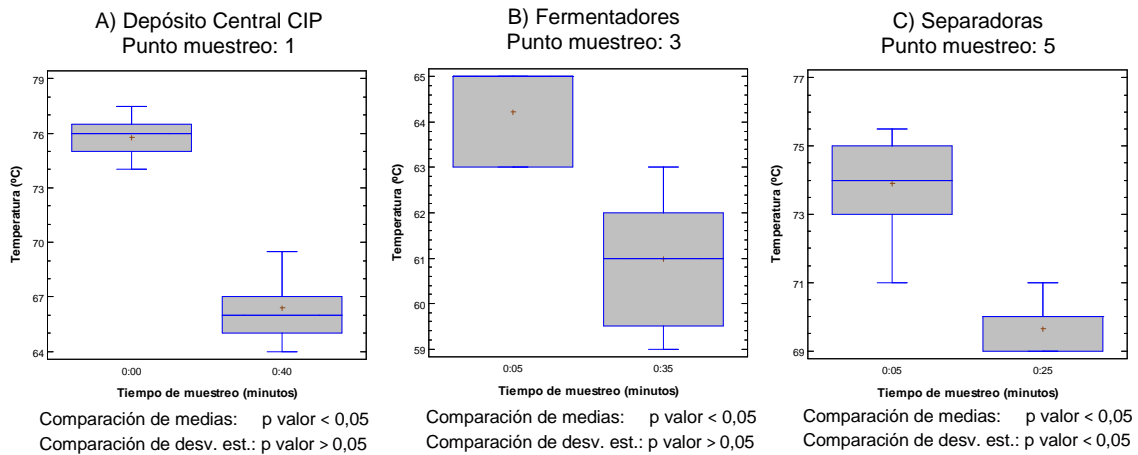


**Figura 7: Gráficas de control de conductividad del ácido nítrico durante la limpieza ácida**

En la Figura 7A y 7B, la diferencia entre los valores de Cp y Cpk indica que el proceso se encuentra descentrado ya que los valores de conductividad del ácido se encuentran por encima de la línea central o parámetro (línea verde, valor nominal 70mS). Sin embargo el valor del Cp es superior 1,33 en ambos casos, por lo que podemos decir que el proceso es capaz y opera dentro de los límites de control y de especificación.



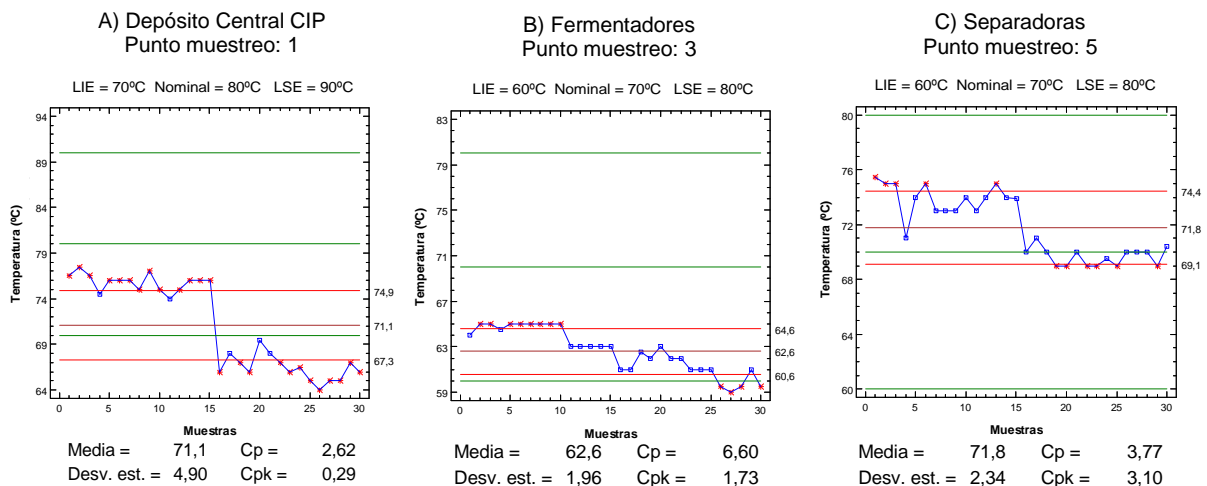
### 5.1.3. Temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina



**Figura 8: Gráfico de cajas y bigotes de temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina**

En la Figura 8A se observa un marcado descenso de la temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina. El análisis de comparación de medias indica que existe diferencia significativa (p-valor inferior a 0.05) entre las medias de la temperatura de sosa al inicio de la limpieza (tiempo 0:00 min) y tras finalizar misma (tiempo 0:40 min). Lo mismo ocurre en la Figura 8B y 8C.

El análisis de comparación de desviaciones estándar indica que no existe diferencia significativa (p-valor superior a 0.05) en el punto de muestreo 1 y 3 ya que los datos se encuentran agrupados en cada tiempo de muestreo. En el punto de muestreo 5 (Figura 8C), los datos correspondientes al tiempo de muestreo 0:05 minutos se encuentran dispersos, por lo tanto en este caso sí existe diferencia significativa entre la desviación de la temperatura a los 0:05 minutos y a los 0:25 minutos (p-valor inferior a 0.05).



**Figura 9: Gráficas de control de temperatura de la sosa durante la limpieza alcalina**

En el diseño del sistema de CIP de la fábrica se han realizado cálculos y se ha determinado que la pérdida de calor a lo largo del sistema es de unos 10°C. Por ello el parámetro de temperatura (línea verde, valor nominal) en los fermentadores y separadoras es 70°C y en el depósito de la Central CIP 80°C.

En la Figura 9A, las cruces rojas indican valores fuera de los límites de control ( $\pm 3$  sigma). Las primeras 15 muestras (correspondientes al tiempo 00:00 min), se encuentran por debajo de la línea central o parámetro y las últimas 15 muestras (correspondientes al tiempo 00:40 min), se encuentran por debajo del límite inferior de especificaciones. En la Figura 9A, los valores de temperatura de sosa correspondientes a las primeras 15 muestras (tiempo 00:00) no llegan a alcanzar el parámetro establecido (80°C). Esto podría deberse a la pérdida de calor de la sosa desde el depósito hasta el punto de muestreo atravesando tuberías y válvulas, e inclusive a la pérdida de calor en el momento de la medición. Los valores de temperatura de la sosa al finalizar la limpieza CIP (tiempo 00:40) llegan a alcanzar valores de 64°C, lo que indica una gran pérdida de calor de la sosa durante la limpieza.

En la Figura 9B el descenso de la temperatura de la sosa durante la limpieza de los fermentadores podría esperarse teniendo en cuenta que el cabezal de limpieza dispersa la solución en el interior del mismo, el cual presenta un gran volumen y superficie interna. Todo ello favorece una pérdida de calor al exterior ya que el fermentador no se encuentra aislado térmicamente. La sosa que retorna a la Central CIP después de atravesar el fermentador, ha perdido bastante calor, sin embargo el intercambiador de calor instalado en el depósito no es capaz de subir la temperatura rápidamente y mantenerla en el parámetro establecido durante el proceso. Es por ello que la temperatura en las separadoras a los 25 minutos de la limpieza alcalina también desciende bruscamente como se observa en la Figura 9C. Sin embargo en este caso, al finalizar la limpieza (tiempo 00:25) los valores se encuentran próximos al valor central (línea verde, valor nominal 70°C). Cabe mencionar que la pérdida de calor en el caso de las separadoras es menor debido a la ausencia del cabezal de limpieza y al menor tamaño de la instalación.

Respecto al análisis de capacidad de proceso, en todos los casos el valor de  $C_p$  es superior a 1,33 por lo que el proceso es capaz. Sin embargo la gran diferencia entre el valor del  $C_p$  y  $C_{pk}$  (especialmente en los puntos de muestreo 1 y 3), indica que el proceso se encuentra ampliamente descentrado respecto al parámetro establecido.

### 5.1.4. Conductividad y pH de las aguas de enjuague.

Se registraron los valores de conductividad (mS) y pH del agua durante el enjuague y escurrido final correspondiente a la limpieza de los fermentadores y separadoras.

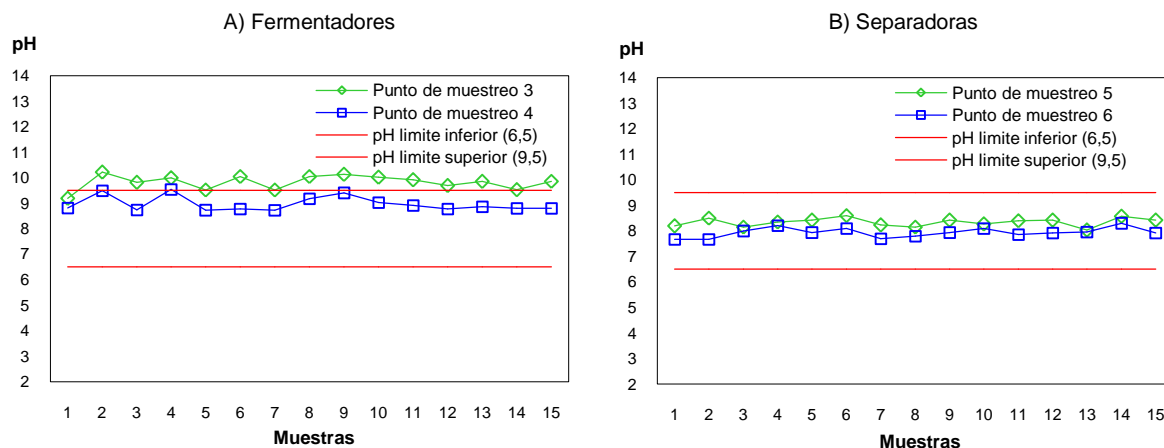


Figura 10: pH de las aguas de enjuague.

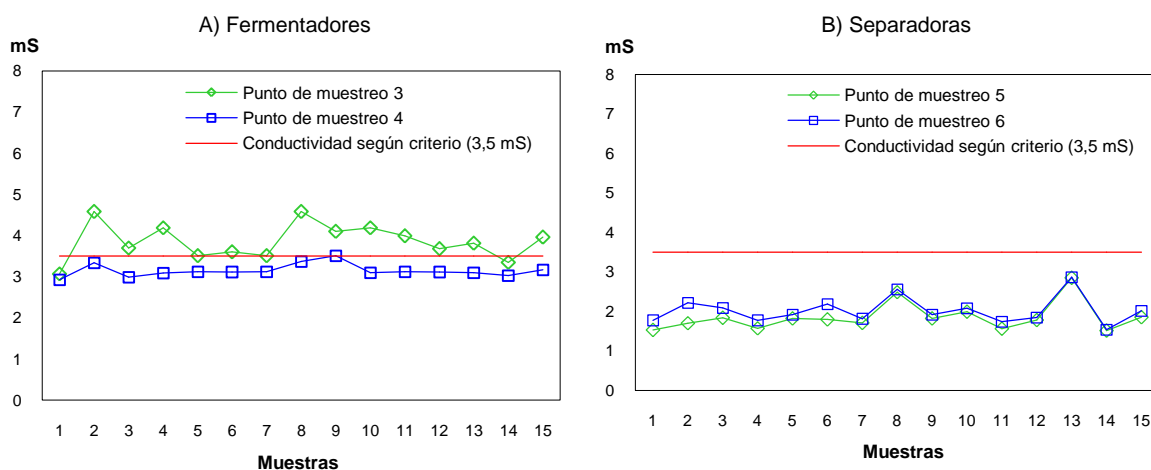


Figura 11: Conductividad eléctrica de las aguas de enjuague.

En la Figura 10 y 11, la línea verde corresponde a los controles del agua durante el enjuague final (punto de muestreo 3 y 5). La línea azul corresponde los controles del agua durante el escurrido final (punto de muestreo 4 y 6). Tal como se mencionó anteriormente, el agua del escurrido final fue establecida como criterio de decisión de validación.

En la mayoría de los casos se observó que la conductividad y el pH del agua es menor en el escurrido final que en el enjuague final en ambos casos. Esto cabía de esperarse ya que el muestreo en los puntos 3 y 5 se realizó a los 3 minutos del enjuague, es decir antes del finalizar el mismo (tiempo total de enjuague: 5 minutos) por lo que aún quedan restos de solución de limpieza.

El agua de enjuague de los fermentadores presentó mayor conductividad y pH que el agua de las separadoras. Cabe resaltar que el enjuague de esta última se realiza con una mezcla variable de agua de proceso y agua osmotizada debido a una mayor eficiencia del consumo de agua en la fábrica. Además la limpieza CIP de las separadoras incluye una etapa adicional de limpieza ácida y el volumen o superficie interna de la instalación es mucho menor que el caso de los fermentadores. Todo ello podría contribuir en obtener menores valores en el caso de las separadoras.

Se observó un pH elevado en el caso de los fermentadores lo cual podría ser debido a la ausencia de limpieza ácida y a la propia dureza del agua de proceso utilizada (en el caso de los fermentadores el enjuague se realiza sólo con agua de proceso), sin embargo el pH se encontró dentro de los límites de especificación respecto al criterio. Por otro lado, la conductividad del agua de enjuague de los fermentadores durante el escurrido final se encontró muy próxima al objetivo.

En todos los casos, los valores obtenidos (línea azul) se encontraron dentro del criterio de decisión establecido en la validación lo que demuestra la efectividad del enjuague en la completa eliminación de los agentes de limpieza.

## 5.2. Control microbiológico

Se obtuvieron excelentes resultados microbiológicos de las aguas de enjuague de los fermentadores (N=30) y separadoras (N=30) dando conformidad en todos los casos (100% conforme) respecto a los criterios de decisión establecidos en la Tabla 5. En los análisis microbiológicos de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia Coli*, los resultados dieron ausencia en todos los casos. En el caso de los gérmenes totales y levaduras sólo se observó lo siguiente:

Fermentadores: se observó un recuento de 1 Ufc/ml de gérmenes totales en 2 de 30 muestras analizadas.

Separadoras: se observó un recuento de 1 Ufc/ml de gérmenes totales en 1 de 30 muestras analizadas, y un recuento de 2 Ufc/ml de levaduras en 1 de 30 muestras analizadas.

El recuento de levaduras (2 Ufc/ml) observado en 1 de las 30 muestras analizadas en las separadoras, se podría atribuir a un caso puntual o error aleatorio debido a diversas variables como: muestreo inadecuado, análisis microbiológico incorrecto o contaminación de la muestra en cualquier punto debido a la posible presencia de células de levadura en el aire.

## 6. CONCLUSIONES

El análisis de resultados indica que los protocolos de limpieza CIP de los fermentadores y sistema de separación son capaces de reproducir sistemáticamente resultados que cumplen con los criterios microbiológicos y fisicoquímicos establecidos durante las 4 semanas del periodo de validación, por lo tanto la limpieza CIP ha sido validada. Tal como establece el Codex en las directrices para la validación de las medidas de control, el protocolo de validación de limpieza CIP con una frecuencia reducida en los controles fisicoquímicos y microbiológicos puede utilizarse como actividad de verificación continua de que los protocolos de limpieza CIP están siendo implementados adecuadamente.

A partir del análisis de capacidad de proceso, se puede concluir que el proceso de limpieza CIP se encuentra *en control* y es *capaz* respecto a los valores de conductividad de sosa y ácido durante el CIP, sin embargo respecto a la temperatura de la sosa es *capaz* pero se encuentra *fuera de control*. Es por ello que podemos recomendar aumentar la capacidad del intercambiador de calor del depósito de sosa de la Central CIP, con el objeto de que el proceso sea *capaz* y se encuentre *bajo control* en relación a la temperatura. De esta manera se podría optimizar la limpieza CIP en tiempo y/o consumo energético de acuerdo a las siguientes opciones:

Opción A: mantener la temperatura de la sosa a 70°C, a la concentración y tiempo establecidos, consiguiendo un ahorro de energía.

Opción B: mantener la temperatura de la sosa a 80°C, a la concentración establecida, pero disminuir la duración de la limpieza consiguiendo un ahorro en el tiempo total de limpieza y también un ahorro de energía debido al menor uso de la instalación.

En ambos casos sería necesaria una revalidación.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

Alfa Laval (2002). Pump Handbook. Pipe sizing. 2º Ed. Alfa Laval: Lund.

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

Berk, Z. (2013). Cleaning, Disinfection, Sanitation. Food Process Engineering and Technology. Food Science and Technology. 2º Ed. Academic Press: New York.

Camper, A., McFeters, G. A., (2000), Problems of biofouling in drinking water systems, in Industrial Biofouling: Detection, Prevention and Control. 15-38.

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

Codex Alimentarius (2008). Directrices para la validación de medidas de control de la inocuidad de los alimentos CAC/GL 69-2008, 1-16.

Lide, David R. (2004) Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press: Boca Raton.

Food and Drugs Administration FDA (1993). Guide to Inspection of Validation of Cleaning Processes. Reference material for FDA Investigators and Personnel, 1-6.

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.

Health Canada (2008) Cleaning Validation Guidelines. Products and Food Branch Inspectorate, 1-11.

O'Rourke, T., (2003). CIP – Cleaning In Place. The Brewer International, 3, 30-34.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. (BOE núm. 45, 21 de febrero de 2003)

Ryther R. (2014). Development of a Comprehensive Cleaning and Sanitizing Program for food Production Facilities. Food Safety Management. Ecolab: Minnesota.

Salo, S., Friis, A., Wirtanen, G., (2008). Cleaning validation of fermentation tanks. Food and Bioproducts Processing, 86, 204-210

Tamine A. Y., (2008). Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations. Society of Dairy Technology Series. Wiley-Blackwell: London.

Timmerman, Hein (2013). Cleaning Validation, Practical Considerations. Journal of Hygienic Engineering and Design, 2, 3-5.

Verran J., Redfern J., Smith L.A., Whitehead K.A. (2010). A critical evaluation of sampling methods used for assessing microorganisms on surfaces food and bioproducts processing, 88, 335-340.

Vilar Barrio, J. F. (2005). Control estadístico de los procesos. FC Editorial: Madrid.