



# **OPTIMIZACIÓN DEL APORTE DE AIRE EN EL PROCESO INDUSTRIAL DE FERMENTACIÓN DE UNA FÁBRICA DE LEVADURA**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Curso: 2015/16**

**Alumno: Irene González Quiroga  
Tutor Académico: Carlos A. Blanco Fuentes  
Tutor empresa: José María 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>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>2</b>
2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en procesos alimentarios .....	2
2.2. Metabolismo de <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> .....	3
2.3. Proceso productivo de la levadura .....	5
2.3.1. Descripción del proceso .....	5
2.3.2. Control del proceso de producción .....	11
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>4. Materiales y métodos</b> .....	<b>14</b>
4.1. Materiales .....	14
4.2. Métodos.....	14
4.3. Procedimiento.....	15
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	<b>17</b>
5.1. Variación de aire incorporado en las fermentaciones.....	17
5.1.1. Fermentación normal.....	17
5.1.2. Fermentación rápida LL.....	19
5.1.3. Fermentación rápida LP .....	20
5.1.4. Fermentación osmotolerante .....	22
5.1.5. Fermentación especial.....	24
5.2. Balance económico .....	27
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>28</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>29</b>

## **1. Resumen**

El aire es uno de los parámetros principales en la fermentación aerobia llevada a cabo en el proceso de producción de levadura de panadería a nivel industrial, del cual depende directamente el porcentaje de oxígeno disuelto en saturación. Debido a esto, el volumen de aire incorporado al proceso puede hacer que ese porcentaje de oxígeno disuelto aumente, provocando un aumento innecesario que cause un mayor gasto energético y por tanto económico. Por el contrario puede disminuir, provocando que durante el proceso tenga lugar la formación de alcohol, el cual no es conveniente que se presente en el producto final. Por ese motivo se han llevado a cabo una serie de ensayos empleando las elaboraciones, referenciadas como: normal, rápida, especial y osmotolerante, en las cuales se pretende disminuir la cantidad de aire incorporado de manera que, el porcentaje en saturación de oxígeno disuelto disminuya desde el porcentaje inicial hasta un valor situado entre un 5 -10 % con un leve aumento al final del proceso de fermentación. Una vez realizadas las pruebas se puede observar que el resultado obtenido conlleva a un ahorro económico en todas las fermentaciones.

### **Abstract**

Air is one of the principal parameters in the aerobic fermentation carried out in the process of production of baker's yeast to industrial level, on which the percentage in saturation of dissolved oxygen depends directly. Due to this, the volume of air incorporated into the process can do that this percentage of oxygen disuelto increases, provoking an unnecessary increase that causes a major energetic expense and therefore economically. On the contrary, this one can diminish, causing that during the process takes place the formation of alcohol, which is not suitable that appears in the final product. For this motive a series of tests have been carried out using the elaborations, indexed like: normal, rapid, special and osmotolerant, in which one tries to diminish the quantity of built-in air so that, the percentage in saturation of dissolved oxygen diminishes from the initial percentage up to a value placed between 5-10 % with a slight increase at the end of the process of fermentation. Once realized the tests it is possible to observe that the obtained result carries to an economic saving in all the fermentations.

## 2. Introducción

### 2.1. *Saccharomyces cerevisiae* en procesos alimentarios

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más empleada en la industria para la elaboración de gran variedad de productos como son por ejemplo el pan y la cerveza. Nuestro interés principal por las levaduras radica en su capacidad fermentadora, es decir, la transformación de azúcares en alcohol y dióxido de carbono y el aporte de unas características adicionales fundamentales para la elaboración de ciertos productos.

*S. Cerevisiae* es un microorganismo unicelular, ampliamente distribuido por el medio ambiente, con forma esférica u oval perteneciente al reino de los hongos, que tiende a prosperar en medios azucarados como flores y frutos (Lee, 2000). La reproducción es generalmente de manera asexual por gemación, en momentos en los que las condiciones medioambientales son desfavorables la reproducción sexual se hace mediante ascosporas.

Su empleo en diversas elaboraciones es conocido desde el año 4.000 a.C. a pesar de que no se tuviera consciencia de ello. Entre las ventajas que posee la levadura en referencia a su producción industrial destacan, el poder de crecimiento a amplios rangos de pH, la facilidad de separación del medio a causa de su tamaño, dando como resultado altos rendimientos y productividades (Lei et al, 2001) y está generalmente reconocida como segura (GRAS).

En este trabajo se hará referencia a las variedades de *S. Cerevisiae* que se emplean en panificación. Las cepas industriales actualmente empleadas, se han ido desarrollando mediante diversas técnicas de selección, para adaptarse mejor a los sistemas de cultivo y tipos de proceso. La capacidad fermentadora provoca una mejora en la esponjosidad y textura de las masas panarias, y contribuye al aroma y sabor.

El siguiente punto a tratar en este apartado será el metabolismo de *Saccharomyces* y el proceso industrial mediante el que se produce para poder comprender mejor, la realización de este trabajo.

## 2.2. Metabolismo de *Saccharomyces Cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo, sensible a la represión catabólica de la glucosa. Por lo general la presencia de oxígeno origina que el consumo de glucosa por parte de la levadura se produzca por metabolismo respiratorio en el caso de una concentración de glucosa adecuada o por fermentación con la consiguiente formación de etanol. El consumo de etanol es un fenómeno respiratorio (Mahjoub et al., 1994).

- **Metabolismo respiratorio de la glucosa**

Teóricamente, en concentraciones bajas de glucosa, esta se encuentra totalmente oxidada y produce un alto nivel de energía en forma de ATP, de esta manera se puede determinar que 1 gramo de glucosa produce 0,5 g de biomasa, por lo que se produce 0,5 g de levadura.



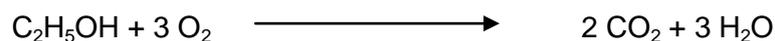
- **Metabolismo fermentativo de la glucosa**

Si se presenta una concentración de glucosa elevada en presencia de oxígeno, la levadura fermenta glucosa produciendo etanol al igual que en condiciones de anaerobiosis, además la baja producción de energía (ATP), conlleva un bajo crecimiento de levaduras por lo que 1 gramo de glucosa produce 0,19 g de biomasa, 0,45 g de etanol y 0,01 g de acetato.



- **Metabolismo respiratorio del etanol**

El etanol producido en la etapa de fermentación es reconsumido en ausencia total de glucosa y presencia de oxígeno, de manera que un gramo de etanol produce 0,55 g de biomasa durante el metabolismo.



Sonnleitner & Kappeli (1986) hacen referencia a las tres vías metabólicas existentes que ocurren durante la etapa de fermentación de levaduras de panificación.

Estas vías son: oxidación de glucosa ( $R_1$ ), reducción de glucosa ( $R_2$ ) y oxidación del etanol ( $R_3$ ), y se encuentran ordenadas por la capacidad respiratoria de las células. Cuanto mayor es el flujo de sustrato en relación con la capacidad respiratoria la vía  $R_2$  está activa, mientras que sólo en el caso de que sea menor estarán activas  $R_1$  y  $R_3$ .

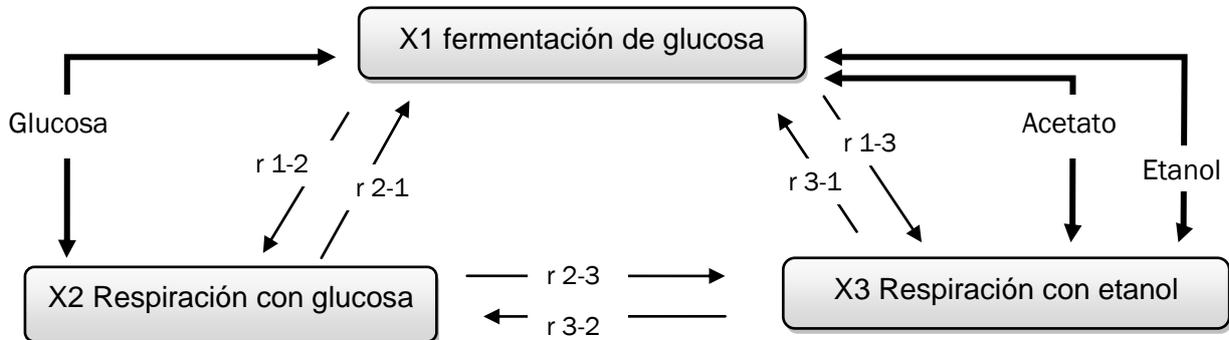


Figura 1. Modelo triangular del metabolismo de la glucosa

En el metabolismo de *S. cerevisiae*, pueden llegar a tener lugar dos efectos importantes que son:

- **Efecto Pasteur**

En presencia de  $O_2$ , *Saccharomyces cerevisiae* realiza una respiración aeróbica. Por tanto según observó Pasteur en presencia de aire y con una cantidad de glucosa limitada, se forma muy poca cantidad de alcohol, prácticamente despreciable, siendo el  $CO_2$  el principal producto de esta reacción aeróbica.

Este proceso provoca un mayor rendimiento energético de la respiración sobre la fermentación. La producción de energía en forma de ATP/mol de sustrato respirado es mucho mayor que la que se podría obtener en fermentación empleando la misma cantidad. Además, en este efecto interviene un mecanismo de regulación metabólica que específica que la cantidad máxima de glucosa que puede ser absorbida sufre un decrecimiento en condiciones aeróbicas (Parés & Juárez, 1997).

- **Efecto Crabtree**

También conocido como “efecto glucosa” se refiere a que, en el momento en el que la concentración de azúcar en el medio es elevada, *Saccharomyces cerevisiae* sólo lo metaboliza por vía fermentativa, incluso en presencia de oxígeno, siendo imposible la fermentación.

El efecto Crabtree ha sido discutido y explicado por numerosos investigadores (Kesten D. et al., 2015; Krull R. et al., 2016). Este efecto posee consecuencias importantes en el cultivo industrial de levaduras, causadas por la producción de etanol que afecta a la producción de biomasa. Para evitar que se produzca etanol, lo que se debe hacer en el proceso es regular la cantidad de azúcar que se añade.

### **2.3. Proceso productivo de la levadura**

El proceso productivo a nivel industrial comenzó en el año 1781, con el denominado proceso “Ducht”, y fue continuado en el año 1846 por el proceso “Vienna”. Con el desarrollo de ambos procesos se obtenían rendimientos entre el 5–14% respectivamente en cuanto a las materias primas se refiere, y una producción de alcohol alrededor del 30%.

En el año 1879, Marquardt introdujo en el proceso de fermentación la aireación, con el único objetivo de aumentar el rendimiento de la levadura y disminuir en un 10% la producción de alcohol.

Desde este momento comienza la etapa de mejora del proceso ya que el siguiente paso fue el aporte gradual de azúcar, consiguiendo mediante este paso una eficacia elevada, similar al máximo teórico y sin formación de alcohol. Hoy en día la producción industrial de levaduras se realiza en sistemas tipo “batch” basado en los principios de producción creados en el año 1879 (Yuzgeç, 2010).

#### **2.3.1. Descripción del proceso**

Las etapas básicas en el proceso de fabricación de levadura son 5:

- Aislamiento de la cepa
- Preparación, clarificación y esterilización de melaza
- Propagación de levadura ( producción de levadura madre y propagación a nivel industrial)
- Separación y filtración
- Secado empaquetado y distribución

En la figura 2, se observan las etapas comprendidas entre la propagación industrial de levadura y su distribución

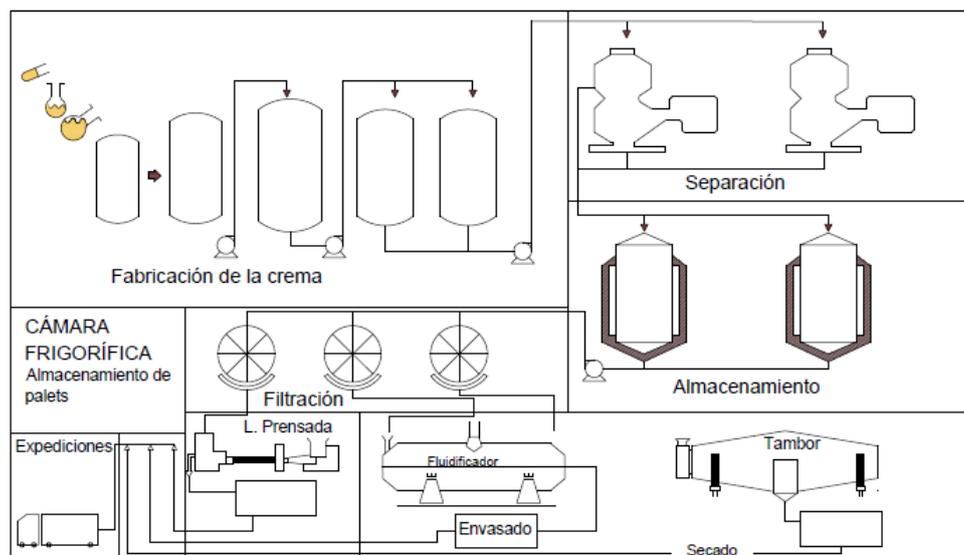


Figura 2. Esquema de la producción de levadura

#### - Aislamiento de la cepa

En esta primera fase se realizará la elección de la levadura que se considere más adecuada para la elaboración que se va a realizar, permitiendo que produzca una levadura prensada con las cualidades necesarias para que se lleve a cabo una correcta fermentación de las masas.

Estos primeros pasos se realizan en el laboratorio bajo condiciones de estricta esterilidad, de manera que partiendo de un banco de células, se aíslan aquellas que posean mejores características de estabilidad en la multiplicación, conservación y medición de su poder fermentativo. La conservación de las cepas se hace en refrigeración a 4°C en solución al 10% en sacarosa, en caso de siembra manual se conserva en congelación a -80°C. Cada compañía especializada en la fabricación de levadura dispone de un gran número de cepas, pero solamente 2 ó 3 cepas se procesan a nivel industrial debido a su adaptabilidad al medio en el que se produce y por motivos de productividad. (Calaveras, 2004, Di serio et al., 2003).

#### - Preparación, clarificación y esterilización de la melaza

La melaza es el elemento nutritivo principal de la fabricación, por lo que en esta fase se realiza la preparación de una solución de carbohidratos a pH constante. Para poder realizarlo es necesario el control automático de la relación agua/melaza y del pH. Seguidamente la solución formada sufre una preesterilización a 90°C y a

continuación una centrifugación a 6000 r.p.m. que provoca la separación de los limos. Después se esteriliza en un intercambiador de calor a una temperatura entre 90-120°C y por último se enfría de 120 a 80°C en el mismo intercambiador y a esa temperatura se conserva (Quaglia, 1991).

Con el fin de homogeneizar los medios nutritivos y limitar el peligro de toxicidad, todos los lotes son analizados y mezclados. Después de la primera filtración para eliminar todos aquellos elementos extraños, la melaza se diluye y calienta para disminuir su viscosidad. A continuación se produce el paso por la centrífuga que elimina las fibras y coloides que pudieran encontrarse en suspensión. Seguidamente, se somete a la melaza a un proceso de pasteurización rápido a 130°C, bajo presión, durante un tiempo muy corto. Este tratamiento permite eliminar los contaminantes microbianos, así como las esporas de *Clostridium* y *Bacillus*, por último dentro de esta etapa, la melaza tratada es almacenada en un depósito tampón, y está preparada para su utilización (Adrian, 1996).

#### - **Propagación de la levadura**

En 2004, Calaveras describió el proceso de propagación de la levadura distinguiendo las dos etapas más importantes, que son la producción de levadura madre y la propagación a nivel industrial.

##### o **Producción de levadura madre**

El principal objetivo de esta primera etapa es la producción de biomasa de levadura para posteriormente sembrar en los fermentadores industriales.

Este tipo de fermentación comienza con el sembrado de 10 ml de medio de cultivo en un tubo a partir de un medio sólido inclinado y se conserva en refrigeración durante un tiempo de incubación de 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo tiene lugar la inoculación de un pequeño vial en un fermentador de laboratorio denominado minox en condiciones de anaerobiosis, forzando a la levadura a fermentar los azúcares, y la consiguiente formación de etanol.

Posteriormente, se transfiere a un fermentador de mayor tamaño de manera aséptica la totalidad del contenido. La temperatura del fermentador se regula por circulación de agua fría en su camisa doble. Al cabo de unas horas, se tendrá una

cantidad suficiente de levadura, que junto al caldo de cultivo se transfiere a un tercer fermentador.

El medio presenta unas condiciones anaeróbicas al inicio y gradualmente se introducirá aire para concluir la etapa de manera aeróbica. Esto es posible debido a que el fermentador se encuentra dotado de una parrilla en su parte inferior interna por la que se insufla aire filtrado a presión. El control de temperatura en este caso se realizará mediante intercambiadores de placas, en contracorriente con el agua fría. Se realizan controles de pH y microbiológicos de competidores potencialmente indeseables. En esta etapa, la fermentación es de tipo “set-batch”, es decir, que los nutrientes son añadidos de una sola vez al principio, esterilizándose antes de la siembra de la levadura. En este tipo de fermentaciones, se pueden observar cuatro etapas típicas del crecimiento de microorganismos:

1. Fase de latencia: también conocida como fase de adaptación, durante la cual los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo). En esta fase se presenta una gran actividad metabólica, pero no un incremento del número de células debido a su alto contenido proteico y el peso seco de las células.
2. Fase logarítmica o exponencial: Al finalizar la primera fase las células se han adaptado a las nuevas condiciones, lo que provoca que la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación es mínimo. Durante esta etapa las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.
3. Fase estacionaria: En esta fase no se incrementa el número de microorganismos debido a que los nutrientes se van agotando y los productos son excretados por el organismo. Esta fase tiene gran importancia debido a que es en la que se puede observar el estado metabólico real de los microorganismos en ambientes naturales. La biomasa aumenta sólo gradualmente o permanece constante durante esta fase estacionaria.
4. Fase de latencia Si la incubación continua después de que la población alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero en ese momento comienza una disminución progresiva del número de células viables y en el momento que sucede se entiende que esa población ha entrado en fase de muerte.

En la última etapa de este apartado, conocida como GII se comienza a trabajar en “fed–batch” lo que significa que la adición de nutrientes se realiza de forma gradual para eliminar los efectos de represión por las fuentes de carbono evitando su acumulación y favoreciendo su rápida eliminación, consiguiendo reducir la viscosidad del medio y los efectos de los constituyentes tóxicos. Este tipo de sistema de cultivo, es empleado en la mayoría de los procesos de fermentación industrial en los que el producto se forma después de la fase de crecimiento exponencial. De esta manera, se consigue un mayor rendimiento de biomasa. En la producción de levadura de panadería, las fermentaciones en modo set–batch se detienen al finalizar la fase exponencial para continuar en modo fed–batch.

Durante esta etapa, los fermentadores disponen de un sistema de aireación. El diseño de los fermentadores aireados se realiza de manera que se facilite la eficacia del intercambio gaseoso. Cuando la cantidad de azúcar fermentable aumenta, se requiere un incremento del volumen de aire, y así satisfacer las necesidades respiratorias necesarias para el rápido crecimiento de la levadura presente. Si la cantidad de aire es deficiente, la respiración y el crecimiento tendrán lugar por fermentación alcohólica y el desarrollo de levaduras se verá reducido.

Esta etapa va seguida de una centrifugación del contenido del fermentador para separar las células de levadura del resto del medio de cultivo agotado, que pasa a la depuradora para su tratamiento. Por otro lado la levadura obtenida se almacena en suspensión acuosa a 4°C, en recipientes refrigerados con agitación.

En la figura 3 se observan las diferentes etapas de un proceso de propagación incluyendo la producción de levadura madre y la propagación industrial. (Gómez–Pastor et al., 2011).

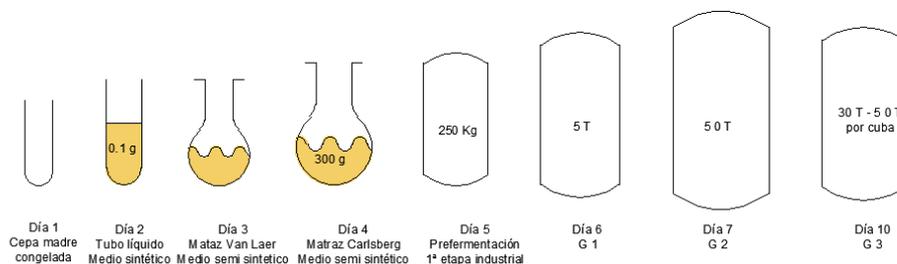


Figura 3. Identificación de etapas de fermentación

○ **Propagación industrial**

La segunda etapa se lleva a cabo en tanques de acero inoxidable con una capacidad comprendida entre 180 y 200 m<sup>3</sup> y tiene lugar después de una fase intermedia de adaptación a la pauta metabólica de las levaduras (Gómez-Pastor et al., 2010). La fermentación dura aproximadamente 16 horas, lo que permite la producción de aproximadamente 38 a 40 toneladas de levadura comercial a partir de 3 toneladas de levadura madre.

A partir de este momento, comienza la producción de levadura comercial, destinada a la venta. Partiendo de la crema obtenida en la centrifuga se siembran varios fermentadores dotados de un sistema de aireación semejante al descrito anteriormente. Una vez ha finalizado esta etapa se procede a la separación y lavado de la levadura por centrifugación. Los efluentes producidos en esta etapa se envían a la estación depuradora. La levadura producida se transporta hasta la zona de empaquetado, donde se observan diferentes elaboraciones; levadura líquida o prensada. Además del control de temperatura y pH, otro factor a tener en cuenta es el nivel de oxígeno en el medio.

Las necesidades nutritivas de la levadura de panadería en el proceso de producción, se satisfacen con el agregado de melaza o azúcar como fuente de carbono; urea o agua amoniacal como fuente de nitrógeno, minerales, oligoelementos, vitaminas, aire y agua.

Este momento es importante puesto que es en el que se desarrolla la capacidad fermentativa, así como la aptitud de conservación de sus propiedades organolépticas y funcionales.

- **Separación y filtración**

En la etapa de separación y filtración se separa la levadura en suspensión del resto de líquido resultante de la fermentación y se lava para la eliminación de sales, gomas y materia colorante. En esta etapa la maquinaria principal es una centrífuga en continuo que concentra la levadura.

En la mayoría de los casos, la levadura se comercializa en forma de pasta con un 30% de materia seca, para realizar este proceso se adiciona cloruro sódico a la crema

para aumentar la presión osmótica y provocar una migración del agua hacia el exterior. La mezcla pasa por un filtro rotativo donde se produce una deshidratación, después de un lavado para eliminar el exceso de sal se produce una rehidratación mediante agua extracelular de la levadura. El producto al final de esta etapa se conoce como levadura prensada.

- **Secado, empaquetado y distribución**

La etapa de secado es opcional y consiste en la extracción del agua residual de la levadura, produciendo una levadura con un porcentaje superior al 92 % de materia seca, una vez se ha extraído el agua se empaqueta en los formatos acordados con el cliente. Las diferentes formas de presentación son: crema de levadura, levadura prensada y levadura seca activa. Por último el proceso de distribución se realiza en refrigeración en el caso de crema de levadura y levadura prensada.

### **2.3.2. Control del proceso de producción**

En la producción de levadura de panadería a nivel industrial, las fermentaciones se encuentran destinadas a obtener una mejor productividad (gramos de células/dm<sup>3</sup>.h) y un mayor rendimiento de biomasa (gramos de células/gramos de sustrato azucarado), de manera que se determina que el método “fed-batch” está bien adaptado para lograr los resultados deseados (Borowiak et al., 2012, Yuzgeç et al., 2009). Los objetivos secundarios de este proceso son: conseguir una variación mínima en cuanto a la calidad del producto final se refiere, así como una disminución de la factura eléctrica, ya que se pretende disminuir el volumen total de aire incorporado al proceso.

El rendimiento de biomasa se encuentra muy relacionado con la etapa metabólica predominante, por lo que si la concentración de glucosa está disponible en exceso en el cultivo, la productividad es alta, pero el rendimiento bajo, con la consecuente producción de etanol. En cambio, si la concentración de glucosa es limitada, la productividad es baja y el rendimiento alto, produciéndose el efecto Pasteur (apartado 2.2).

En el estudio realizado se controló la variación del aire incorporado durante el proceso de fermentación de los cinco tipos de levadura (normal, rápida LL, rápida LP, osmotolerante y especial). Lo que se observó durante las pruebas fue la modificación

de la curva de oxígeno disuelto (Abel et al., 1994) en comparación con la curva que se presentaba antes de las pruebas.

La oxigenación del proceso se realiza por aireación de la superficie, a menudo inyectando aire u oxígeno (Kilani & Lebeault, 2007; Singh, 1999). El aporte adecuado de oxígeno es fundamental en fermentaciones aeróbicas, y esto implica aireación (Kilani & Lebeault, 2007; Lu-Kwang & Sundararajan, 1994). El aire incorporado al proceso es aire filtrado, inyectado en el fondo de las tinas para provocar la agitación del mosto de fermentación. En ausencia de agitación mecánica, es necesario entre 10–12 m<sup>3</sup> de aire por kg de levadura, disminuyendo la proporción en presencia de agitación (Calaveras, 2004).

En este estudio, de manera similar al realizado en 2008 por Blanco et al., se realizó una optimización del porcentaje de oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación pero en este caso y contrariamente a aquel estudio en lugar de observarse varios parámetros, únicamente se tomo como referencia el volumen de aire incorporado al proceso. Además para ambos estudios se emplearon sondas nuevas en la fábrica, siendo de mayor precisión y exactitud la empleada en este último. De igual forma se puede observar que, en el estudio anterior se mejoró la medida del volumen de aire a partir de un mayor número de parámetros entre los que destacan el oxígeno, la temperatura, el etanol o el pH, sin embargo en el presente estudio se busca la modificación de la curva de oxígeno disuelto de manera que en las primeras horas el volumen incorporado fuera inferior en las pruebas que en las fermentaciones actuales, y que a partir de un punto en la fase final comenzase a aumentar para incrementar el % en saturación de oxígeno disuelto en la fermentación.

A través de estas pruebas se comprueba que durante las fermentaciones existe una cantidad de oxígeno disuelto en exceso, que supone un gasto energético innecesario, pues con el ajuste hecho en las pruebas se consigue ahorrar un 9,05% en fermentación normal, 7,10% en fermentación rápida LL, 8,75% en fermentación rápida LP 3,22% en fermentación osmotolerante y un 5,22% en fermentación especial, de manera que se consigue un ahorro anual total alrededor de 70.000 €.

### 3. Objetivos

Como en el apartado anterior ya se ha definido el contexto, en el que va a tener lugar el desarrollo de este Trabajo Fin de Máster y la causa por la cual desarrollar una nueva estrategia para optimizar el proceso de producción de levadura de panadería, se puede determinar que el objetivo principal es:

***Disminuir el volumen de aire incorporado en la etapa de fermentación aeróbica del proceso de elaboración de levadura de panadería con el propósito de conseguir un ahorro de hasta el 4% en la factura eléctrica de aireación, y mantener el rendimiento sin alterar las características del producto.***

Para lograr el objetivo principal por el cual se desarrolla este proyecto se establecen una serie de objetivos secundarios que se deben cumplir:

- Definir un rango óptimo del volumen de aire incorporado de modo que afecte mínimamente a las características funcionales y organolépticas del producto final.
- Confirmar que la disminución del aporte de aire favorece de manera positiva el proceso productivo.
- Ajustar las sondas en los fermentadores asegurando su calibración y consiguiendo que la fermentación se realice de manera adecuada.
- Asegurar que la disminución del volumen de aire total incorporado conlleva un menor consumo de energía eléctrica, y por tanto un ahorro económico.

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Materiales

Para determinar la cantidad del aire incorporado a la cuba durante el proceso de fermentación de la levadura comercial se empleó:

- Sonda óptica con sensor de O<sub>2</sub> (InPro® 6000 Optical O<sub>2</sub> Sensors)
- Transmisor de medidas de parámetros (Multiparameter Transmitter M800)
- Fermentadores
- Software informático empleado para el control de fermentaciones en la empresa
- Excel 2007

En este estudio se va a modificar el volumen de aire incorporado en el proceso de fermentación, medido en Nm<sup>3</sup> (unidad de volumen de gas a una presión de 1 atm y temperatura de 0°C empleada en fábrica) en las siguientes elaboraciones:

- *Fermentación normal*: Produce levadura destinada a masas de desarrollo lento.
- *Fermentación rápida*: Produce levaduras destinadas a masas de desarrollo rápido. Se evaluarán dos tipos, denominadas LL y LP.
- *Fermentación osmotolerante*: Produce levadura destinada a masas con alto contenido en azúcar
- *Fermentación especial*: Produce levadura destinada a masas ácidas.

### 4.2. Métodos

La sonda empleada en este estudio permite medir el porcentaje en saturación de oxígeno disuelto en el fermentador por un método de detección óptica basado en la extinción de la fluorescencia en presencia de oxígeno produciéndose una transferencia de energía entre el cromóforo presente en la sonda y el oxígeno.

El cromóforo que está unido a la sonda se ilumina de color azul, cuando éste absorbe energía en ausencia de oxígeno emite una fluorescencia de color rojo con un tiempo de respuesta y de vida, siendo reconocida por un detector situado en la cabeza del sensor. En caso de presencia de oxígeno, no existe transferencia de energía entre el cromóforo y el oxígeno, ya que este disipa la energía en forma de calor en el medio ambiente y por tanto no produce fluorescencia. Con el fin de analizar la duración de la

fluorescencia, la luz excitada envía pulsos a una frecuencia constante. La luz emitida posee un perfil similar pero con un tiempo de cambio relativo a la excitación conocido como ángulo de fase ( $\phi$ ). El ángulo de fase depende del nivel de oxígeno y está alineado con la correlación Stern–Vollmer. Por tanto el sensor detecta el cambio de fase y calcula la concentración en tanto por ciento de oxígeno en saturación. El valor medido se transfiere al transmisor que es el encargado de remitir al ordenador los datos de oxígeno disuelto en la biomasa durante la fermentación, de modo que se puedan analizar para comprobar el proceso de fermentación.

Para que estos equipos funcionen de manera adecuada, se adquieren con una calibración realizada al aire con el cien por cien de oxígeno saturado en unas determinadas condiciones seleccionadas por el fabricante. Una vez se han instalado en fábrica, se debe realizar una calibración, en función de su proceso productivo. Para ello en un medio acuoso se realiza un medio de siembra con  $8000 \text{ Nm}^3$  de aire, y se mantiene 10 minutos hasta que se estabilice, dando a ese valor obtenido el cien por cien de oxígeno en saturación.

En cuanto a la calibración de estos equipos se prevé que puedan estar aproximadamente 15 días sin calibrar, a pesar de ello y al ser de reciente instalación, se está observando cada fermentación para determinar si se puede ampliar el tiempo de funcionamiento sin que llegue a descalibrarse. El método de calibración empleado por el fabricante del transmisor de datos para sondas ópticas de oxígeno como es este caso, es una calibración por fluorescencia por medio de una referencia interna. Durante el proceso lo que se hace es medir en varios momentos y extrapolar por encima del rango de medición. Para una calibración en fábrica, se realiza una calibración en función del proceso según se explicó anteriormente.

### **4.3. Procedimiento**

El trabajo realizado consiste en la modificación del porcentaje en saturación de oxígeno disuelto durante el proceso de fermentación mediante una variación del volumen de aire incorporado. Para ello se realizaron varias pruebas dentro de cada tipo de fermentaciones de manera que no afecte a las características del producto final, y asegure un ahorro energético que conlleve por tanto un ahorro económico.

Para la realización de estas pruebas lo que se realizó fue una relación entre el volumen de aire incorporado al proceso en  $\text{Nm}^3$  entre cada tonelada de melaza al 50% añadida, por lo que se realizan los siguientes pasos:

- **Determinación de ratio teórico (ratio th)**

Para calcular el ratio th, hay que realizar un paso previo que consiste en calcular el ratio individual de cada una de las elaboraciones mediante el volumen de aire incorporado en  $\text{Nm}^3$  entre la melaza al 50% incorporada en cada una de ellas. Una vez obtenidos los ratios de las diferentes elaboraciones se realiza un promedio de las elaboraciones que pertenecen al mismo tipo de fermentación, y a continuación para calcular el ratio th lo que se realiza es un cálculo, a partir del cual se asegura que el porcentaje en saturación del oxígeno disuelto disminuya hasta valores situados entre 5-10% a las 4 horas y media de fermentación.

- **Determinación del volumen de aire incorporado en las pruebas aire prueba en función del ratio th:**

Una vez se ha determinado el ratio th a las 4 horas y media, se realiza el cálculo inverso, es decir, partiendo de los valores promedios de la cantidad de melaza añadida de las distintas elaboraciones del último mes multiplicado por el ratio th calculado anteriormente, se obtiene el volumen de aire incorporado necesario para realizar la fermentación y disminuir así el porcentaje en saturación de oxígeno disuelto.

- **Propuesta de una nueva receta:**

Una vez calculado ese aire prueba, se fija una receta, similar a la curva obtenida que modificará la actual. A partir de ese momento se comienza con la realización de pruebas en cada una de las fermentaciones. Si estas pruebas una vez estudiadas y observadas resultan satisfactorias se mantienen como fijas en todas ellas y se comienzan a tomar los valores necesarios para poder realizar el estudio de manera adecuada.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Variación de aire incorporado en las fermentaciones

#### 5.1.1. Fermentación normal

Después de una serie de ensayos previos realizados en la fermentación normal, los cuales no se han considerado introducir en esta memoria para no hacerla más extensa, ya que su único objetivo era ajustar de forma aproximada la disminución de aire incorporado, se llevó a cabo la fermentación definitiva tomada para las pruebas. En la figura 3 se visualiza el cálculo del ratio  $\theta$ , donde se observa una disminución directa del ratio promedio desde el punto inicial, hasta un valor entre 10 y 5 a las 4 horas y media de la fermentación y manteniendo ese margen hasta el final de la fermentación.

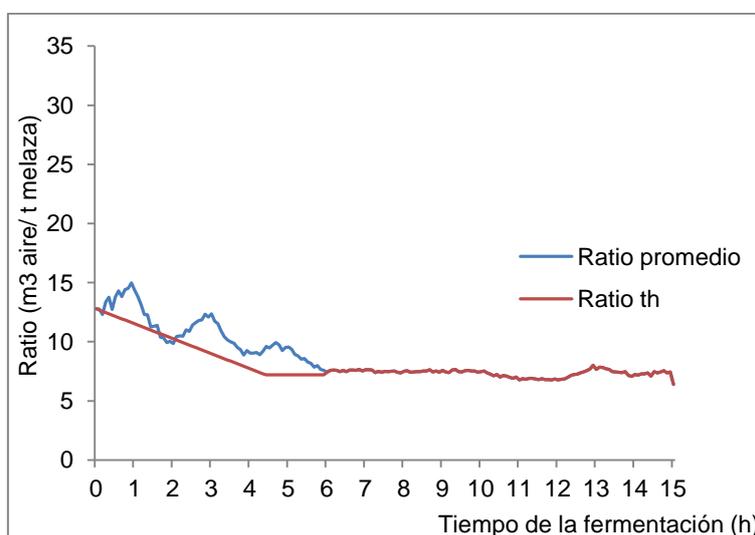


Figura 3. Ratio teórico (Ratio  $\theta$ ) calculado para la asignación del volumen total de aire a incorporar en las pruebas de fermentación normal frente al ratio promedio

Una vez que se ha obtenido el ratio teórico y según se indica en el procedimiento, es decir, multiplicándolo por la melaza al 50%, se realizó la determinación del volumen de aire a incorporar durante el proceso de pruebas (a. prueba), que se comparará en la figura 4 con el aire empleado actualmente (a. actual).

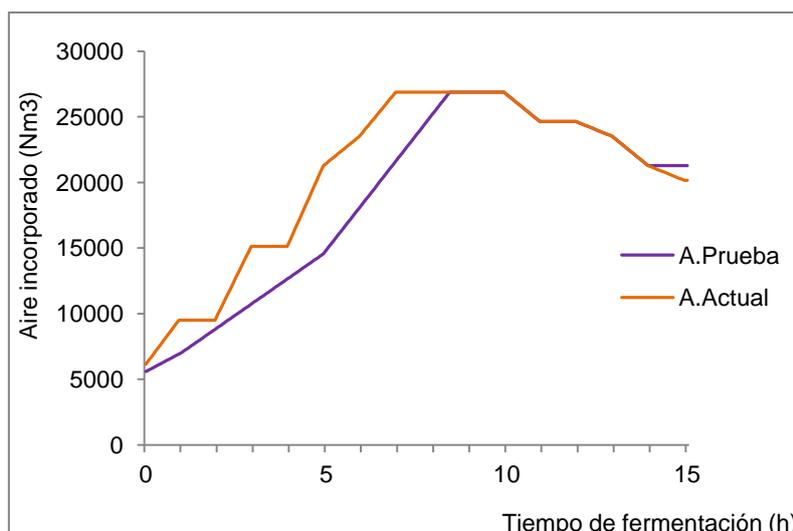


Figura 4. Aire incorporado en la fermentación normal actual frente al aire incorporado en las pruebas

En la figura 4 se puede observar que el promedio del volumen de aire incorporado durante las primeras 8 horas y veinte minutos, es menor en el proceso de pruebas que en el proceso actual. Además se puede observar como en lugar de disminuir el volumen incorporado en la última fase se mantiene hasta el final, para conseguir que se incremente el porcentaje de oxígeno en saturación, según se observa en la figura 5.

De igual manera, en la figura 5 se puede observar cómo el porcentaje en saturación de oxígeno disuelto es menor en el periodo de pruebas que en el periodo actual, comprobando cómo en este tipo de fermentación se ha logrado el objetivo buscado, que era disminuir el porcentaje en saturación de oxígeno disuelto al inicio de la fermentación, y una posterior subida del mismo en la última etapa del proceso para evitar la formación de alcohol, y su presencia en el producto final.

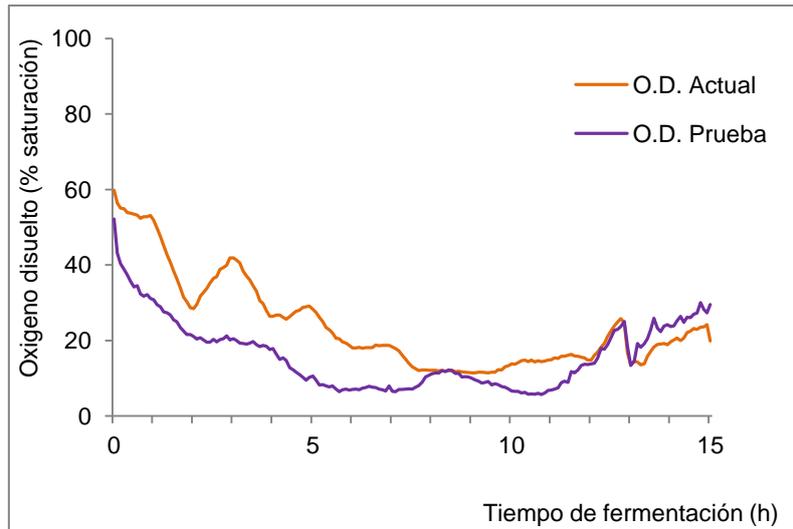


Figura 5. Oxígeno disuelto en fermentación normal frente al oxígeno disuelto en pruebas

### 5.1.2. Fermentación rápida LL

En esta fermentación se va a seguir el mismo procedimiento expuesto en el apartado anterior, de manera que en la figura 6 se determina la modificación llevada a cabo del ratio según el procedimiento

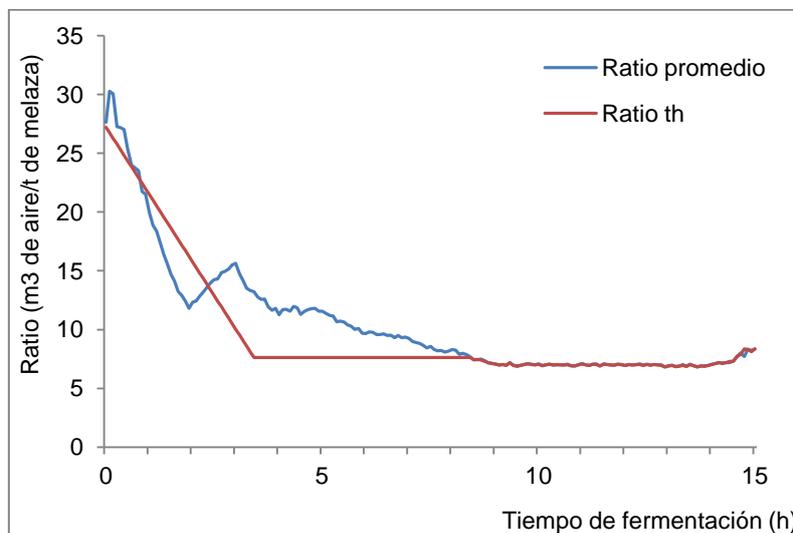


Figura 6. Ratio teórico (Ratio th) calculado para la asignación del volumen total de aire a incorporar en las pruebas de fermentación rápida LL frente al ratio promedio

De esta manera, se puede comprobar en la figura 7 como la incorporación de aire durante las primeras 9 horas es menor en el proceso de pruebas que en el proceso actual, y cómo en las primeras pruebas, una vez se ha alcanzado el volumen

máximo de aire incorporado se mantiene hasta el final al igual que en la fermentación anterior.

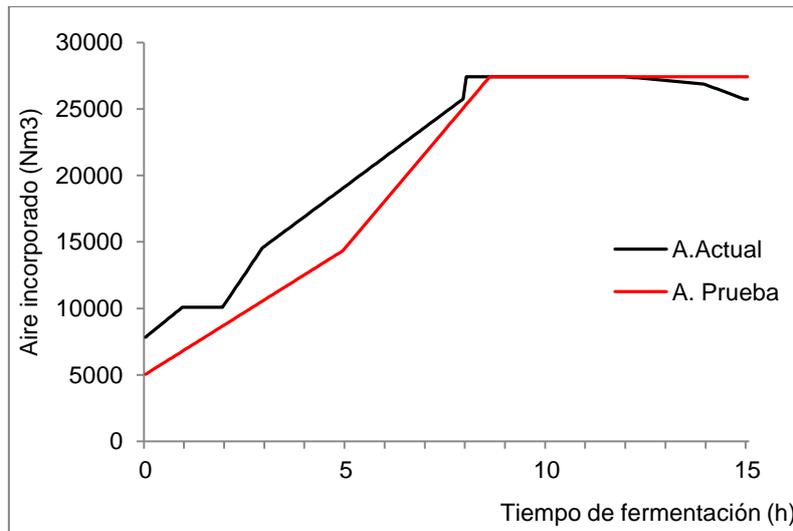


Figura 7. Aire incorporado en la fermentación rápida LL actual frente al aire incorporado en las pruebas

En la figura 8 se observa la disminución del porcentaje de saturación de oxígeno, con el consiguiente incremento del mismo al final de la fermentación.

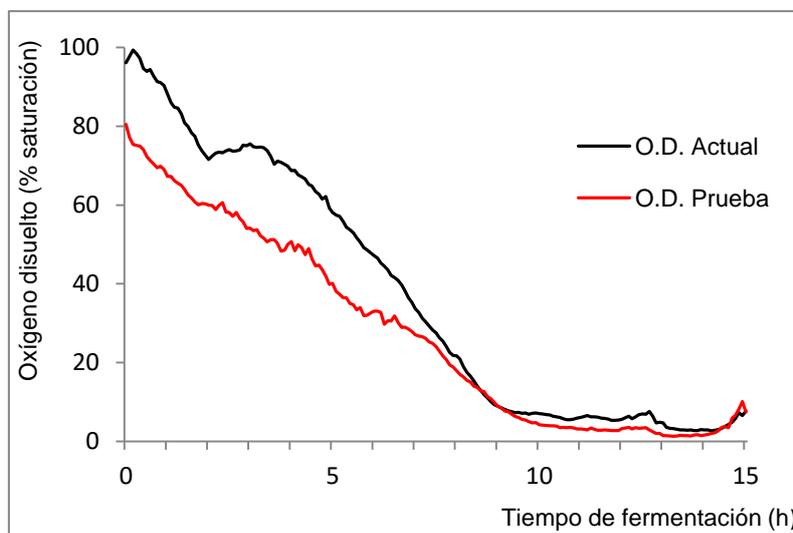


Figura 8. Oxígeno disuelto en fermentación rápida LL frente al oxígeno disuelto en pruebas

### 5.1.3. Fermentación rápida LP

En el tercer tipo de fermentación y continuando con el mismo procedimiento que en los casos anteriores y según se observa en las figuras 9, 10 y 11 presentadas

en este apartado, primeramente se obtendrá el ratio teórico a partir del cual se calculará el volumen de aire a incorporar.

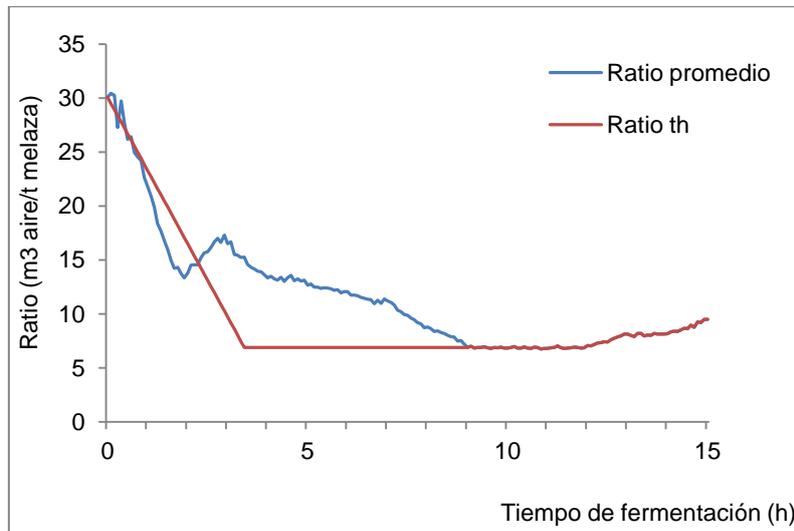


Figura 9. Ratio teórico (Ratio th) calculado para la asignación del volumen total de aire a incorporar en las pruebas de fermentación rápida LP frente al ratio promedio

Realizando este cálculo, se determinó que el volumen de aire incorporado durante las pruebas en el proceso de fermentación debía ser menor que el aire incorporado en las fermentaciones rápidas LP en la actualidad, según se puede observar en la figura 10.

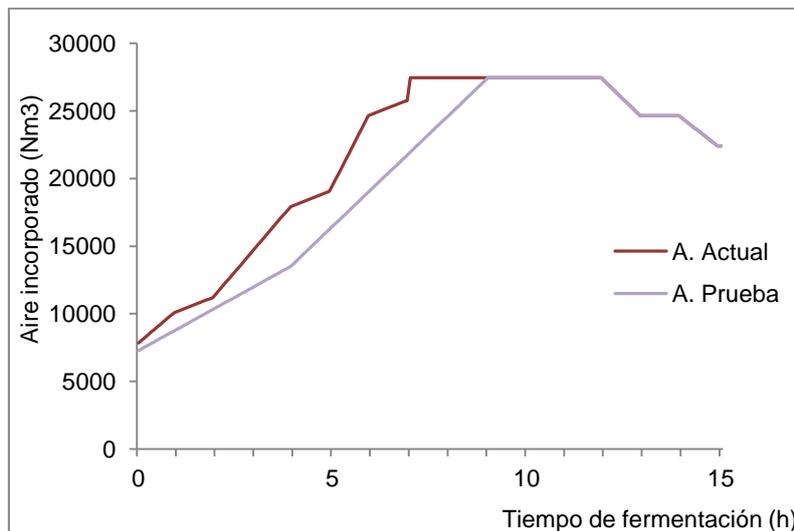


Figura 10. Aire incorporado en la fermentación rápida LP actual frente al aire incorporado en las pruebas

De esta manera, se observa como la incorporación de aire durante las primeras 9 horas y cinco minutos es inferior en el proceso de pruebas que en el proceso anterior, y como a partir de ese punto ambas fermentaciones continúan incorporando la misma cantidad de aire hasta el final del proceso.

Según se puede observar en la figura 11, el porcentaje en saturación de oxígeno disuelto de las pruebas es inferior durante toda la fermentación. Una observación con respecto a esta figura es que se puede observar como el porcentaje en saturación del oxígeno disuelto actual posee un incremento similar al buscado en la prueba, por lo que esa parte no se modifica en este caso.

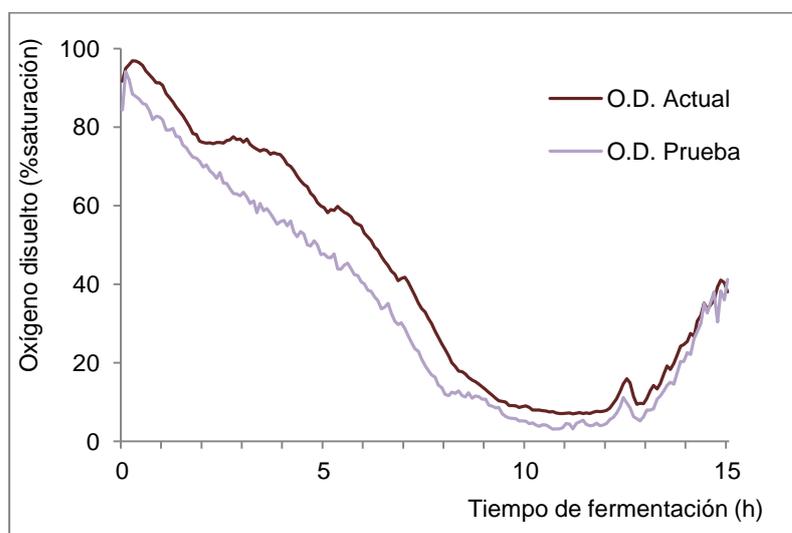


Figura 11. Oxígeno disuelto en fermentación rápida LP frente al oxígeno disuelto en pruebas

#### 5.1.4. Fermentación osmotolerante

En la fermentación osmotolerante se llevará a cabo el mismo procedimiento que en los apartados anteriores, ya que es similar en todos ellos, diferenciándose en la receta empleada para su elaboración.

En la figura 12 se representa el ratio promedio procedente de cada una de las fermentaciones frente al ratio teórico calculado

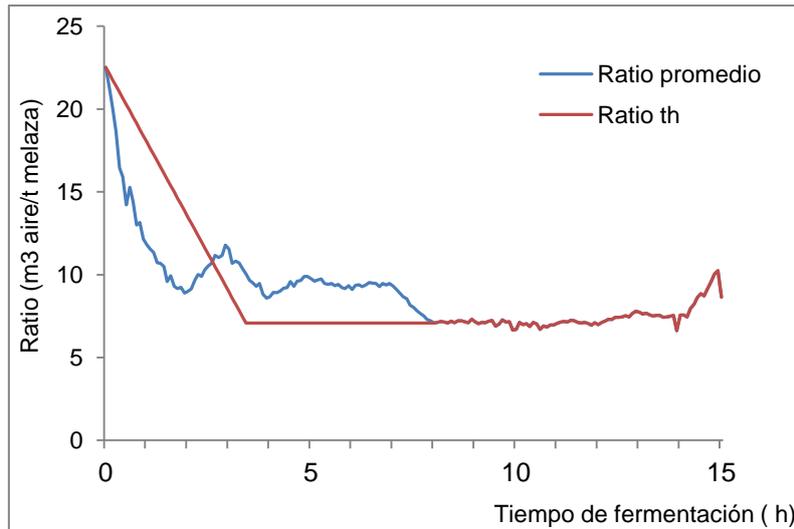


Figura 12. Ratio teórico (Ratio th) calculado para la asignación del volumen total de aire a incorporar en las pruebas de fermentación osmotolerante frente al ratio promedio.

En la figura 13 se puede observar cómo la incorporación de aire durante las primeras 7 horas es inferior en el proceso de pruebas que en el proceso actual, de igual forma que se puede comprobar que a partir de ese momento la incorporación de aire se mantiene igual en la actualidad que en las pruebas.

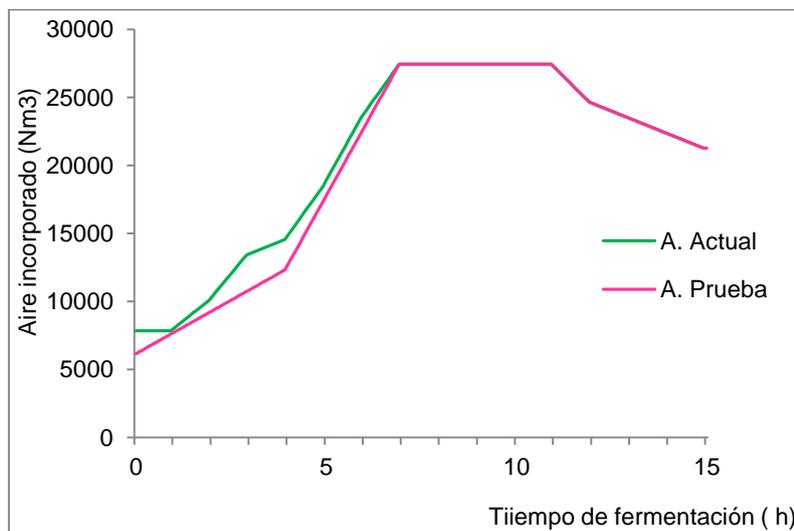


Figura 13. Aire incorporado en la fermentación osmotolerante actual frente al aire incorporado en las pruebas

En la figura 14 se puede determinar que la modificación del % en saturación del oxígeno disuelto en las pruebas no se diferencia en un resultado significativo del % en saturación del oxígeno disuelto en las fermentaciones actuales.

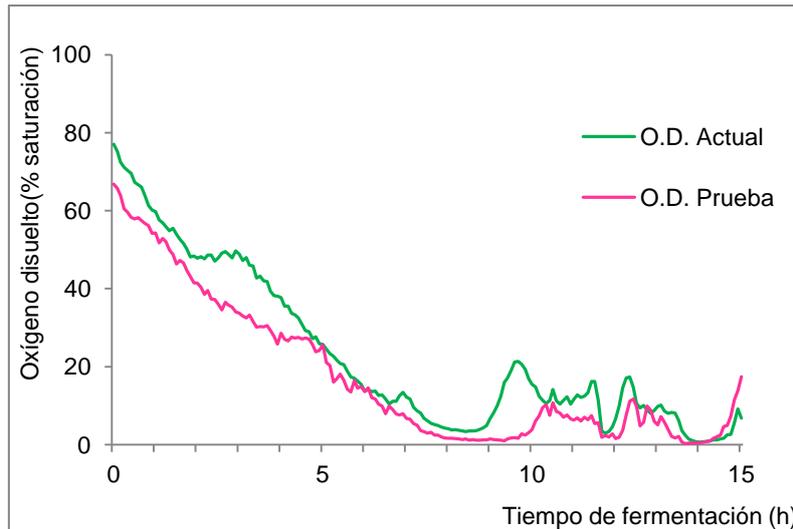


Figura 14. Oxígeno disuelto en fermentación osmotolerante frente al oxígeno disuelto en pruebas

### 5.1.5. Fermentación especial

En este último tipo de fermentación se continúa con el mismo procedimiento expuesto en todos los apartados anteriores, de manera que al inicio se determina el ratio teórico a partir del cual se obtiene el nuevo volumen de aire a incorporar al proceso que se puede observar en la figura 15.

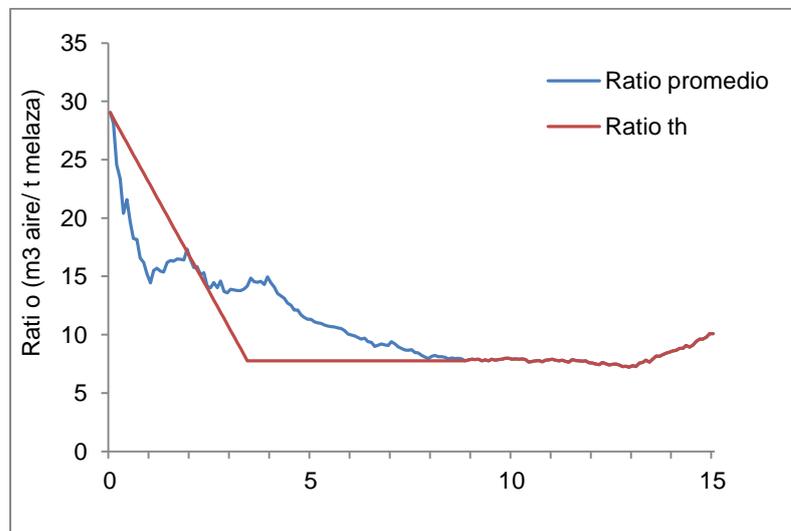


Figura 15. Ratio teórico (Ratio th) calculado para la asignación del volumen total de aire a incorporar en las pruebas de fermentación especial frente al ratio promedio

De esta manera, se observa en la figura 16 como la incorporación de aire durante las primeras 9 horas es menor en el proceso de pruebas y cómo a partir de

ese punto se continúa con igual volumen de aire incorporado hasta el final de la fermentación.

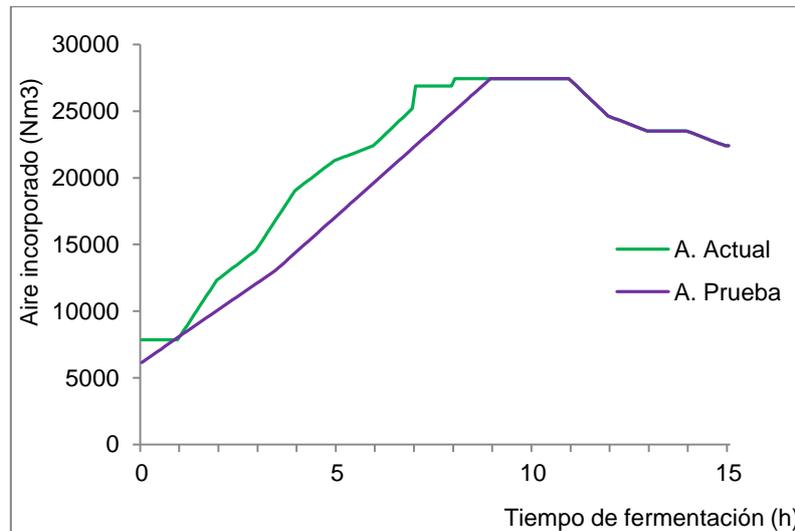


Figura 16. Aire incorporado en la fermentación especial actual frente al aire incorporado en las prueba

En la figura 17 se puede observar como el porcentaje en saturación de oxígeno disminuye al igual que en otros casos, pero se observa una diferencia característica en esta fermentación con respecto al resto y es el descenso del porcentaje en la hora 12, esto es debido a una brusca bajada del pH provocando que no se pueda aumentar el porcentaje en saturación de oxígeno al final de la fermentación.

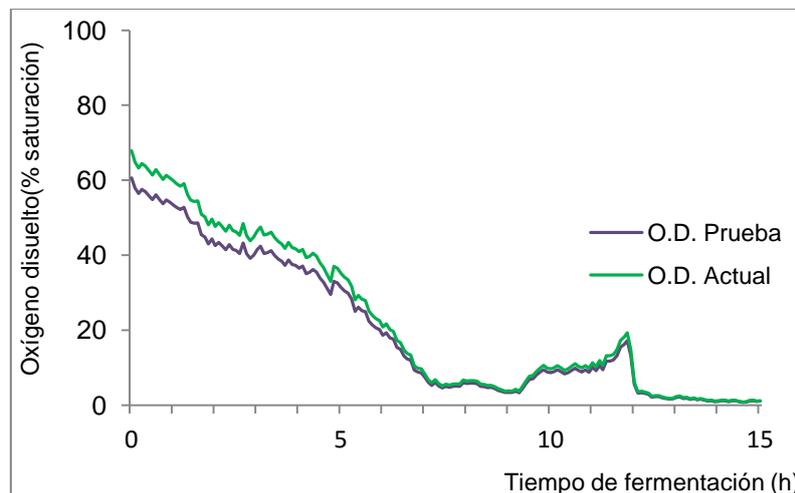


Figura 17. Oxígeno disuelto en fermentación especial frente al oxígeno disuelto en pruebas

Para comprobar que el volumen de aire total incorporado a los distintos procesos variaba de las fermentaciones existentes frente a las pruebas realizadas en cada uno de los tipos, se tomaron 32 datos de aire incorporado en la actualidad, tomados durante el último mes previo a las pruebas, y se realizó un promedio de ellos para cada tipo. Adicionalmente de cada una de las fermentaciones se realizaron una serie de pruebas:

- Fermentación normal: 17 pruebas
- Fermentación rápida LL: 18 pruebas
- Fermentación rápida LP: 6 pruebas
- Fermentación osmotolerante: 8 pruebas
- Fermentación especial: 8 pruebas

En las pruebas se tomo como dato el promedio del volumen de aire incorporado en cada fermentación dando como resultado el volumen de aire incorporado en la prueba. En la tabla 1 se pueden observar los resultados del volumen de aire, así como el % de ahorro de aire en cada fermentación

Tabla 1. Volumen de aire incorporado y ahorrado en los distintos tipos de fermentaciones

	Volumen de aire incorporado (Nm <sup>3</sup> )		Volumen de aire ahorrado	
	Actual	Prueba	Nm <sup>3</sup>	%
Fermentación normal	315,82	287,25	28,57	9,05
Fermentación rápida LL	329,63	306,23	23,40	7,10
Fermentación rápida LP	333,87	204,65	29,22	8,75
Fermentación osmotolerante	317,52	307,30	10,22	3,22
Fermentación especial	327,05	309,98	17,07	5,22

Para concluir con este apartado se determina que según las figuras 3 a 17 y la tabla 1 en donde se muestran los resultados obtenidos en cada una de las fermentaciones, los mayores porcentajes de ahorro de volumen de aire incorporado se producen tanto en la fermentación normal como en la fermentación rápida LP, esto es debido a que en ambos tipos de fermentaciones el porcentaje en saturación del oxígeno disuelto no disminuía tanto en los datos tomados durante el último mes en comparación con las pruebas.

Por el contrario en la fermentación osmotolerante se produce un menor ahorro de aire, puesto que durante el proceso se alcanza un porcentaje de oxígeno en saturación demasiado bajo que de llegar a disminuir más podría llegar a producir sustancias no deseadas para el producto final como es la presencia de alcohol.

## 5.2. Balance económico

Una vez realizadas todas las pruebas, y observados que los resultados obtenidos han sido similares a los valores que se pretendían obtener antes de comenzar el estudio, se ha de determinar el ahorro total que existe en cada receta, primeramente para cada fermentación y finalmente se hará un cálculo teórico de lo que aproximadamente se ahorrará por receta en un año.

Para el cálculo del ahorro por fermentación, conociendo que 1kW/h tiene un precio de 0,068€, y que el consumo eléctrico es de 23 kW por cada 1.000 Nm<sup>3</sup>/h sabiendo que se realizan 40 fermentaciones semanales, las cuales se distribuyen proporcionalmente, es decir, resultando 8 fermentaciones por semana de cada tipo, se obtienen, los resultados presentados en la tabla 2.

Tabla 2. Ahorro económico para las diferentes fermentaciones y ahorro anual.

	Ahorro por fermentación	
	€	€ anuales
Fermentación normal	44,48	18503,61
Fermentación rápida LL	36,43	15152,96
Fermentación rápida LP	45,48	18921
Fermentación osmotolerante	15,90	6615,37
Fermentación especial	26,57	11054,15

Como se ha determinado el ahorro que existe por fermentación y teniendo en cuenta que se realizan 8 semanales de cada tipo, por 52 semanas que tiene el año se estima que el ahorro conseguido variando las curvas de aire incorporado se situaría en torno a los 70.000 € anuales.

## **6. Conclusiones**

Una vez realizadas las consideradas primeras pruebas de cada una de las fermentaciones referenciadas como normal, rápida LL, rápida LP, osmotolerante y especial, y a la espera de los resultados de conservación de la levadura, se puede determinar que el objetivo principal por el cual se ha llevado a cabo este trabajo ha sido satisfactorio.

Del trabajo realizado se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- a) Se ha conseguido disminuir el exceso del oxígeno disuelto en saturación al comienzo de todas las fermentaciones y el aumento del mismo en la etapa final del proceso. Cabe destacar que en la fermentación osmotolerante esa disminución del porcentaje de oxígeno disuelto es menor que en los otros tipos de fermentaciones, porque el volumen total de aire incorporado ha sido menor para evitar la formación de alcohol durante el proceso ya que el porcentaje de oxígeno en saturación disminuía a valores cercanos al 0%.
- b) La disminución de aire incorporado en cada proceso fermentativo, a falta de los resultados de conservación, no ha provocado variaciones significativas en el producto final, es decir, que se ha conseguido un producto con características similares al que se elaboraba antes de realizar las pruebas, resultando un dato positivo puesto que se consigue un producto similar evitando un exceso del porcentaje de oxígeno en saturación.
- c) Este estudio ha permitido optimizar el proceso de crecimiento de la levadura con un aporte menor de aire incorporado durante el proceso de fermentación, lo cual se ha traducido en un ahorro energético por fermentación que conduce a un ahorro anual entorno a 70.000€.

Lamentablemente y debido a temas de confidencialidad, no se han podido revelar algunos datos reales con el fin de evitar que algunos detalles concretos del avance que supone este estudio, puedan ser accesibles a otras empresas del mismo sector. Por ello hay datos que se encuentran con factor corrector o incluso abreviaturas cuyo significado no se puede desvelar.

## 7. Bibliografía

Abel, C., Hübner, U., & Schügerl, K. (1994). Transient behaviour of Baker's yeast during enforced periodical variation of dissolved oxygen concentration. *Journal of biotechnology*, 32(1), 45-57.

Adrián, J. (1996). La panificación: aspectos socioeconómicos. *Materias primas. Agentes de fermentación*.

Blanco, C. A., Rayo, J., & Giralda, J. M. (2008). Improving industrial full-scale production of baker's yeast by optimizing aeration control. *Journal of AOAC International*, 91(3), 607-613.

Borowiak, D., Miśkiewicz, T., Miszczak, W., Cibis, E., & Krzywonos, M. (2012). A straightforward logistic method for feeding a fed-batch baker's yeast culture. *Biochemical Engineering Journal*, 60, 36-43.

Bursali, N., Akay, B., Ertunc, S., Hapoglu, H., & Albaz, M. (2001). New tuning method for generalized predictive control of the production of *S. cerevisiae*. *Food and bioproducts processing*, 79(1), 27-34.

Calaveras, J. C. (2004). *Nuevo tratado de panificación y bollería*.

Di Serio, M., Aramo, P., De Alteriis, E., Tesser, R., & Santacesaria, E. (2003). Quantitative analysis of the key factors affecting yeast growth. *Industrial & engineering chemistry research*, 42(21), 5109-5116.

Gómez-Pastor, R., Garre, E., Matallana, E., & Pérez-Torrado, R. (2011). *Recent advances in yeast biomass production*. INTECH Open Access Publisher.

Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., & Matallana, E. (2010). Improving yield of industrial biomass propagation by increasing the Trx2p dosage. *Bioengineered bugs*, 1(5), 352-353.

Hocalar, A., & Türker, M. (2010). Model based control of minimal overflow metabolite in technical scale fed-batch yeast fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 51(1), 64-71.

Kesten, D., Kummer, U., Sahle, S., & Hübner, K. (2015). A new model for the aerobic metabolism of yeast allows the detailed analysis of the metabolic regulation during glucose pulse. *Biophysical chemistry*, 206, 40-57.

Kilani, J., & Lebeault, J.M. (2007). Study of the oxygen transfer in a disposable flexible bioreactor with surface aeration in vibrated medium. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74, 324-330

Krull, R., & Peterat, G. (2016). Analysis of reaction kinetics during chemostat cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* using a multiphase microreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 105, 220-229.

Lee, B. H. (2000). *Fundamentos de biotecnología de los alimentos*. Acribia.

Lei, F., Rotbøll, M., & Jørgensen, S. B. (2001). A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 88(3), 205-221.

Lu-Kwang, J., & Sundararajan, A. (1994). The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors: physical presence of cells as solid particles. *The Chemical Engineering Journal*, 56, B15-B21.

Mahjoub, M., Mosrati, R., Lamotte, M., Fonteix, C., & Marc, I. (1994). Fuzzy control of baker's yeast fed-batch bioprocess: A robustness study. *Food research international*, 27(2), 145-153.

Parés, R., & Juárez, A. (2007). *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté.

Quaglia, G. (1991). *Ciencia y tecnología de la panificación*. Zaragoza: Acribia.

Singh, V. (1999). Disposable bioreactor for cell culture using wave-induced agitation. *Cytotechnology*, 30, 149-158.

Yüzgeç, U. (2010). Performance comparison of differential evolution techniques on optimization of feeding profile for an industrial scale baker's yeast fermentation process. *ISA transactions*, 49(1), 167-176.

Yüzgeç, U., Türker, M., & Hocalar, A. (2009). On-line evolutionary optimization of an industrial fed-batch yeast fermentation process. *ISA transactions*, 48(1), 79-92.