



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Estudio de la formación y eliminación del fouling, biofouling y biofilms en la industria láctea.

Alfons Eduard Guerrero Navarro

Tesis doctoral

Memoria presentada al Departament de Ciència Animal i dels Aliments, de la
Facultat de Veterinària en la Universitat Autònoma de Barcelona.

Para optar al grado de Doctor en Ciencia de los Alimentos.

Trabajo dirigido por el Prof. José Juan Rodríguez Jerez y el Dr. Abel Guillermo
Ríos Castillo.

Facultat de Veterinària

Bellaterra, Diciembre 2017

JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular del área de nutrición y
bromatología del *Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat
de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona* y ABEL GUILLERMO
RÍOS CASTILLO, doctor en Ciencia de los Alimentos por la *Universitat Autònoma
de Barcelona*

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “Estudio de la formación y eliminación del fouling,
biofouling y biofilms en la industria láctea”, presentada por Alfons Eduard
Guerrero Navarro para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de
Barcelona*, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada,
autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión
correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en
Bellaterra, a 20 de setiembre de 2017.

José Juan Rodríguez Jerez

Abel Guillermo Ríos Castillo

Publicaciones generadas durante la tesis

Patentes:

- Rodríguez-Jerez J.J., Guerrero-Navarro A.E., Ríos-Castillo A.G. 2016. PROCESS FOR REMOVING THE FOULING DEPOSITED IN A MILK PROCESSOR UNIT AND A CLEANING SOLUTION USED THEREIN. European Patent. Ref.: 16174235.8 – 1358. (Evaluada positivamente y pendiente de publicación).
- Rodríguez-Jerez J.J., Guerrero-Navarro A.E., Ríos-Castillo A.G. 2017. PROCESS FOR REMOVING THE FOULING DEPOSITED IN A MILK PROCESSOR UNIT AND A CLEANING SOLUTION USED THEREIN. International Patent. Ref.: PCT/EP2017/064130. (Pendiente de evaluación).

Participación en congresos científicos:

- Guerrero-Navarro A.E., Ríos-Castillo A.G., Rodríguez-Jerez J.J. Enhanced cleaning protocols in the dairy industry. Developing a method for the evaluation of cleaning procedures at laboratorial scale. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. 30th EFFoST. Athens, Greece, 2015
- Ríos-Castillo A.G., Guerrero-Navarro A.E., Rodríguez-Jerez J.J. Microscopic evaluation of milk fouling over stainless steel surfaces. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. 30th EFFoST. Athens, Greece, 2015

- Guerrero-Navarro A.E., Rios-Castillo A.G., Ripolles-Avila C, Rodríguez-Jerez J.J. Composition of the fouling formed on surfaces of milk facilities. A model for the development of new products for specific cleaning”. 31th EFFOST. Vienna, Austria, 2016
- Guerrero-Navarro A.E., Rios-Castillo A.G., Ripolles-Avila C, Rodríguez-Jerez J.J. Demonstration of a new enzymatic cleaning procedure to remove milk fouling in a dairy pilot plant”. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. 32th EFFOST. Sitges, Spain, 2017 (Aceptado, pendiente de presentar)

Estas son las publicaciones generadas por el trabajo de esta tesis, dado el periodo de confidencialidad de las patentes, la publicación en revistas científicas ha sido retrasada y las participaciones en congresos han tenido un contenido muy específico (no protegido por las patentes).

Proyectos financiados

- Proyecto Europeo FP7-KBBE-2013-7. Contrato número 613732. Enabling the drying process to save energy and water, realising process efficiency in the dairy chain (ENTHLPY). 1-11-2014 – 31-10-2016

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la confianza del Prof. José Juan Rodríguez Jerez y el Dr. Abel Guillermo Ríos Castillo, al elegirme para llevar a cabo esta tarea, brindarme toda su experiencia y todo su apoyo, para poder lograr los objetivos de esta tesis. Unos objetivos interrelacionados con los de otros excelentes trabajos, al participando en el proyecto europeo ENTHALPY.

Gracias a todo el equipo humano del grupo de investigación del Prof. José Juan, por su apoyo tanto durante el trabajo como fuera de él. He tenido la suerte de entrar en un equipo en el que me sentí acogido, como en casa y donde todo el mundo aporta su grano de arena al conocimiento de los demás.

Sin olvidar todo el personal del Departamento de Ciencia de los Alimentos y el de Microbiología de la Facultad de Veterinaria, que me han ayudado o simplemente aguantado en esos días de estrés tanto en el laboratorio como en el comedor. Y a los miembros del equipo del Prof. Jordi Mas, en el Departamento de Microbiología y Genética, que me ayudaron y me empujaron a realizar el doctorado, durante el master.

Y por último todo esto no sería posible sin el apoyo de mi familia y mi novia, que son los primeros que me han ayudado a llegar hasta aquí. Sin su ayuda y cariño, todo este proceso sería mucho más difícil, duro y mucho menos agradable de lo que ha sido.

Resumen:

El trabajo aquí contenido está englobado dentro del Proyecto Europeo ENTHALPY (EU-FP7), un proyecto multidisciplinar y multinacional, donde se busca la mejora de la industria lechera europea, mediante la innovación en la tecnología, optimización de procesos y mejora de la gestión de las empresas. Las líneas prioritarias fueron: la reducción del consumo de agua y energía, por parte de este sector de la industria alimentaria, dada su gran demanda de agua para diversos procesos industriales, entre los que destacan la limpieza, y el gasto de energía en algunos procesos, como los térmicos, por ejemplo, la pasteurización o esterilización de la leche.

Dada la perspectiva general del proyecto, se enfocó esta tesis en la evaluación y mejora del tratamiento de la problemática relacionada con el fouling lácteo. Este tipo de residuo, generado durante el procesado de la leche con el empleo de altas temperaturas, tiene unas afectaciones sobre la instalación y consecuentemente sobre todo el sector.

Su presencia implica un gran consumo de agua y energía, para intentar su eliminación, por lo que un estudio de este residuo ayudará a mitigar sus efectos, aparte de profundizar en el conocimiento sobre ello, uno de los objetivos importantes fue el de encontrar una forma de eliminar el fouling lácteo mediante enzimas, una estrategia, que aunque no es novedosa en sí misma, permite un elevado grado de personalización, para adaptarla a esta problemática y, sobre todo, por una serie de beneficios colaterales a su empleo, ya que permiten una mejora integral y específica, lo que permite una reducción de los costes de producción.

Todos estos objetivos se llevaron a cabo mediante la creación de un modelo de laboratorio de fouling lácteo, para poder trabajar sobre un equivalente del residuo, para su estudio a escala laboratorio, creado bajo demanda, de forma fácil y de bajo coste. Esto ha permitido poder probar nuevas técnicas de limpieza sobre él. Un modelo de laboratorio es de gran interés dada la localización del residuo en la industria, en el interior de instalaciones y maquinaria de difícil acceso, que cuando han de ser abiertas o desmontadas, consumen una gran cantidad de tiempo, personal y dinero de la empresa.

A partir de la creación del modelo de laboratorio, se probaron distintos productos de limpieza industrial, tanto comerciales como de creación propia. Esto nos permitió elegir la mejor formulación, para acabar con este residuo lácteo. Estos resultados se escalaron a escala de planta piloto, haciendo un procesado estándar de leche, con la finalidad de ensuciar toda la instalación, para luego limpiar con métodos clásicos y con la nueva solución desarrollada y propuesta en este estudio.

Los datos recogidos, durante la última etapa de los experimentos, rebelaron un gran nivel de movilización del fouling lácteo, tras el empleo de la nueva formulación enzimática elegida y patentada. Los costes de uso se han mostrado muy inferiores a los registrados durante el uso de un producto químico tradicional (control), para limpiar instalaciones industriales. Aparte de los costes inferiores, los requerimientos de agua y energía fueron siempre inferiores, dando como resultado un producto fruto de la investigación, con muy buenos resultados en entornos reales.

Abstract:

This work is a part of the European project ENTHALPY (EU-FP7), a multidisciplinary and multinational project with the objective of improving the European dairy industry, using innovative technology, process optimization and better business management. The main purpose was the reduction of the water and energy usage in the food industry, given the fact that the consumption of both is quite high and demanding for various processes like cleaning or thermal processes such as pasteurization or milk sterilization.

With the purpose of the project in mind, this thesis was focused on the problem of milk fouling. This kind of residue made during the thermal process of milk at high temperatures, have a massive effect over the facilities and therefore to the sector.

The presence of milk fouling increases the water and energy consumption during cleaning processes, and a better understanding of this residue would help industry for a better cleaning. Besides the study of this residue, one of the main objectives was to create an efficient way for cleaning the fouling with enzymes. Even though it is not a new and innovative strategy by itself, it can be highly customized to adapt the cleaning process to the problem, given some indirect benefits that will decrease the production costs.

All these objectives were achieved through the development of a milk fouling model, which was cheap and easy to manipulate, for the study of cleaning tests for new products. Working with a fouling model is useful because milk fouling is deposited typically in closed facilities of difficult access that cost a lot of time and money to be opened.

With the fouling model, it was possible to test commercial and new products for the cleaning of fouling. Once the best formula was selected, it was scaled to a pilot plant experimentation. At the pilot plant, whole milk was processed to generate milk fouling over the facilities, and clean the surfaces with the classic products and with our new product.

All data suggest a great detachment of milk fouling with our enzymatic formula, which was patented, with the potential benefits of having lower cleaning costs, less water and energy consumption, creating an efficient way to clean in real live situations.

ÍNDICE:

I: Introducción	28
II: Objetivos	36
III: Revisión bibliográfica	40
1. Descripción de la materia prima	42
2. Breve reseña histórica de los inicios del consumo de leche	45
3. Tecnificación de los tratamientos de la leche	47
3.1. Tratamientos por el calor más frecuentes.....	49
3.2. Otros sistemas de conservación	51
4. Ensuciamiento de las superficies	53
4.1. Biofilms	53
4.2. Fouling	56
4.3. Biofouling.....	60
5. Sectores afectados	63
6. Fouling en el sector lácteo	66
6.1. Clasificación y composición del fouling lácteo	69
6.2. Seguimiento del fouling lácteo en las instalaciones lecheras	74
7. Limpieza de instalaciones y eliminación de fouling lácteo de las superficies.....	74
7.1. Limpieza empleando métodos químicos.....	78
7.2. Limpieza empleando métodos biológicos	80
7.3. Seguimiento del proceso de limpieza.....	83
8. Modelos de fouling lácteo a escala de laboratorio	84
9. Técnicas de análisis del fouling lácteo	89
IV: Estudio de la formación de un modelo de fouling lácteo y su idoneidad para evaluar productos de limpieza industrial.....	96
1. Material y métodos.....	97
1.1. Fuente del fouling lácteo	97
1.2. Modelo de fouling lácteo en condiciones de ciclos de secado.....	97
1.2.1. Superficies para el fouling lácteo	97
1.2.2. Productos de limpieza	99

1.2.3. Producción del modelo de fouling lácteo (MFM) en condiciones de ciclos de secado	101
1.3. Producción de un modelo de fouling lácteo en condiciones de recirculación	103
1.4. Limpieza del modelo de fouling lácteo	105
1.5. Monitorización de la limpieza del fouling lácteo	107
1.6. Procesado estadístico de los datos.....	108
2. Resultados y discusión	108
2.1. Producción de fouling lácteo en condiciones de ciclos de secado	108
2.2. Producción de fouling lácteo en condiciones de recirculación como control.....	110
2.3. Limpieza de los modelos de fouling lácteo (MFM).....	110
2.4. Monitorización de la limpieza de la limpieza de fouling lácteo.....	113
V: Estudio de la composición del fouling lácteo y posterior perfeccionamiento de un nuevo tratamiento enzimático para su eliminación	116
1. Material y métodos.....	117
1.1. Fuente del fouling lácteo	117
1.2. Superficies para el fouling lácteo.....	117
1.3. Mejora de la solución enzimática para eliminar fouling lácteo.....	119
1.4. Productos de limpieza	121
1.5. Producción del modelo de fouling lácteo adaptado a microscopía (AMFM)	122
1.6. Prueba de los distintos tampones para la limpieza enzimática	124
1.7. Limpieza de los modelos de fouling lácteo adaptado (AMFM)	125
1.8. Estudio de la morfología y topografía del fouling lácteo	126
1.9. Estudio de la fracción orgánica del fouling lácteo	128
1.9.1. Análisis de la composición de la leche cruda de vaca mediante NIRS... ..	128
1.9.2. Microscopía de epifluorescencia directa (DEM) de los AMFM.....	129
1.9.3. Microscopio confocal láser de barrido (CLSM) de AMFM y los residuos de la limpieza	131
1.10. Estudio de la fracción inorgánica del fouling lácteo	134
1.10.1. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) en AMFM	134

1.10.2. Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) de AMFM y residuos de limpieza	135
1.11. Organización de los análisis de los AMFM	136
1.12. Procesado estadístico de los datos	137
2. Resultados y discusión	137
2.1. Resultado de los tampones probados	138
2.2. Resultados iniciales del fouling lácteo	141
2.3. Resultados del análisis morfológico y topográfico de los AMFM.....	143
2.4. Resultados de la fracción inorgánica	145
2.5. Resultados de la fracción orgánica mediante microscopía fluorescente	149
2.6. Resultados de la limpieza de los modelos de laboratorio de fouling adaptado..	155
VI: Pruebas de limpieza en situación real, comparativa en planta piloto entre el tratamiento químico clásico y un tratamiento enzimático de propia creación	156
1. Material y métodos	157
1.1. Fuente del fouling lácteo	157
1.2. Intercambiador de calor en placa (PTH) de la planta piloto.....	157
1.3. Limpieza del fouling lácteo del PTH.....	158
1.3.1. Limpieza alcalina del PTH	159
1.3.2. Limpieza ácida del PTH.....	160
1.3.3. Limpieza enzimática del PTH.....	160
1.4. Atomizador (Spray Dryer) en la planta piloto.....	161
1.5. Limpieza del fouling lácteo del atomizador.....	163
1.5.1. Limpieza alcalina del atomizador	163
1.5.2. Limpieza ácida del atomizador	163
1.5.3. Limpieza enzimática del atomizador.....	164
1.6. Análisis de los residuos	164
1.6.1. Extracto seco de la solución de limpieza.....	165
1.6.2. Análisis de la composición del fouling por NIRS.....	165
1.6.3. Fluorescencia del fouling.....	166
1.6.4. Análisis microbiológico	167
1.7. Muestreadores internos para obtener muestras de fouling real.....	172
1.8. Costes	173

2. Resultados y discusión	173
2.1. Concentración de residuo en los líquidos de limpieza del PTH.....	173
2.2. Movilización del fouling derivado de la producción de leche en polvo	176
2.3. Análisis de los residuos	177
2.4. Resultados del análisis de fluorescencia	180
2.5. Resultados microbiológicos de la instalación	182
2.6. Muestreadores internos para fouling lácteo.....	185
2.7. Costes de limpieza	187
VII: Conclusiones	188
VIII: Bibliografía	192

Abreviaturas y acrónimos.

AENOR: Asociación Española de Normalización y Certificación

AFM: Atomic Force Micorscopy (Microscopio de Fuerzas Atómicas)

AFNOR: Association française de Normalisation (Asociación francesa para la normalización)

AIISI: American Institute of Steel and Iron (Instituto Americano de Acero y Hierro)

AMFM: Adapted Milk Fouling Model (Modelo de fouling lácteo adaptado)

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos

BHCl: Borate Buffer hydrochloric acid (Tampón borato-ácido clorhídrico)

BBS: Borate Buffered Saline (Tampón borato salino)

BP: Baird-Parker agar

BSA: Bovine Serum Albumin (Albumina sérica bovina)

C: Carbono

CBB: Carbonate-Bicarbonate Buffer (Tampón carbonato-bicarbonato)

CHEMFET: Chemically Modifed Field Effect Transistor (Transistor de Efecto de Campo Modificado Químicamente)

CIP: Cleaning-in-place (limpieza *in-situ*)

CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy (Microscopía Láser Confocal de Barrido)

Con A: Concanavalin A

Cr: Cromo

CS: Cleaning Solution (Solución de Limpieza)

CS8m: Cleaning Solution 8 modified (Solución de Limpieza 8 modificada)

DEM: Direct Epifluorescent Microscopy (Microscopía de Epifluorescencia Directa)

EDX: Espectrometría de dispersión de energía de rayos X

EFSA: European Food Safety Authority (Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos)

ENTHALPY: “**EN**abling **TH**e drying process to **sA**ve energy and water, rea**L**ising **P**rocess efficiency in the dair**Y** chain”

EPS: Extracellular Polymeric Substances

EPS: Polisacárido extracelular o exopolisacárido

ETAs: Enfermedades Transmitidas por Alimentos

EU-FP7: Séptimo Programa Marco de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la Unión Europea.

Fe: Hierro

FITC: Fluorescein isothiocyanate

HCl: ácido clorhídrico

HE: heat exchanger (intercambiador de calor)

HHST: Higher-Heat Shorter Time (Alta Temperatura Tiempo Acortado)

HHST: Higher-Heat Shorter Time (Alta temperatura y tiempo acortado)

HNO₃: ácido nítrico

HTST: High Temperature-Short Time (Alta temperatura-tiempo corto pasteurización relámpago)

ICP-OES: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectrometría óptica de plasma acoplada)

IDFA: International Dairy Foods Association (Asociación Internacional de Alimentos Lácteos)

ISO: International Organization for Standardization ((Organización Internacional para la estandarización)

K: Potasio

LAB: Lactic acid bacteria (Bacterias del ácido láctico)

LTH: Low Temperature Holding (mantenimiento/pasteurización a baja temperatura)

MAPAMA: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España

MFM: Milk Fouling Model (Modelo de Fouling Lácteo)

Mg: Magnesio

MRS: de Man, Rogose & Sharpe agar Na: Sodio

NaOH: Hidróxido de Sodio / sosa cáustica

NaOH: sosa cáustica

NIRS: Near Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de infrarrojos cercanos)

NMP: Numero Más Probable

NR: Nile Red (Rojo Nilo)

O: Oxígeno

P: Fósforo

PHE: Plate Heat Exchanger (Intercambiador de calor en placa)

PTH: Plate Thermal Interchanger (Intercambiador de calor en placa)

RPF: Rabbit Plasma Fibrinogen... (Fibrinogéno de Plasma de Conejo)

S: Azufre

SAB: Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (medio de cultivo/nombre del inventor)

SEM: Scanning Electron Microscope (Microscopio electrónico de barrido)

SIMS: Secondary-ion mass spectrometry (Espectrometría de masa iónica secundaria)

TSA: Tryptic Soy Agar (Agar Tripticasa de Soja)

TVC: Total Viable Count (Recuento total de viables/Recuento total aeróbico)

UE: Unión Europea

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

UHT: Ultra-High Temperature (Ultra alta temperatura / uperización /
ultrapasteurización)

UNE: Una Norma Española

UV: Ultravioleta

VNC: Viables no cultivables

VRGB: Violet Bile Red Glucose agar (medio de cultivo Rojo Violeta Glucosa Bilis)

WAXD: wide-angle X-ray diffraction (Difracción de rayos X de amplio ángulo)

Lista de figuras:

Figura 1: Las cinco etapas del desarrollo de un biofilm. 1) primer contacto de las células con la superficie 2) adhesión irreversible 3) maduración formando agregados celulares 4) maduración produciendo una matriz alrededor de las células 5) dispersión. Cada fase está relacionada con una microfotografía de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (credito de la imagen D. Davis, (Monroe. 2007))

Figura 2. Curva de la relación empírica entre energía libre de superficie y la bioadhesión relativa (Representación basada en Brady. 1999)

Figura 3. Perfil vertical de un tapete microbiano, estructura generada por la sucesión de comunidades microbianas y biofilms adaptadas a distintos entornos. (Madigan y cols. 2012)

Figura 4: PHE de acero inoxidable 316 después de pasteurizar leche durante 8 horas (Barish y Goddard. 2013).

Figura 5. PHE obturado por la acumulación de fouling caramelizado (Anónimo, 2007).

Figura 6: Esquema de la trasferencia de proteínas del líquido a la superficie del proceso térmico (Jimenez y cols., 2013).

Figura 7. Clasificación del fouling basada en distintos parámetros como la naturaleza de sus componentes o su solubilidad (Basso y cols., 2017).

Figura 8. Esquematación de los círculos de Sinner. El incremento de uno de estos factores permite disminuir los otros tres factores, obteniendo los mismos resultados de limpieza (Basso y cols., 2017).

Figura 9. Ejemplo de monitorización de la limpieza de un evaporador mediante análisis de la conductividad de la solución de limpieza (Van Asselt y cols., 2002).

Figura 10: Superficie de acero inoxidable 316 2B (5 x 5 cm) con paredes de aluminio (1 cm de altura) para ser usados en la producción del modelo fouling lácteo en laboratorio (MFM).

Figura 11: Esquema simplificado de los pasos para producir modelos de fouling lácteo en el laboratorio (MFM).

Figura 12. Sistema para producir un modelo de fouling mediante leche en recirculación. A) Discos de acero inoxidable 316 2B en el fondo del matraz Kitasato. B) Sistema en funcionamiento en un baño termostático a 90°C.

Figura 13: Esquema simplificado del protocolo de limpieza de los modelos de fouling lácteo (MFM) usando productos con base enzimática.

Figura 14: A) Modelo de fouling lácteo (MFM) B) MFM después de la limpieza enzimática.

Figura 15: Eficacia de la eliminación de fouling lácteo por parte de las distintas soluciones de limpieza, resultados en porcentaje (%), mediana representada por la división de la barra.

Figura 16: Turbidez de distintas soluciones de limpieza en unidades McFarland de turbidez

Figura 17: Superficies para la producción de fouling. A) Discos de acero inoxidable (2 cm de diámetro) tipo 316 y pulido de grado 2B. B) Contenedores para la producción del modelo de fouling adaptado a microscopía con paredes de 0,6 cm de altura.

Figura 18: Modelos de fouling lácteo adaptado (AMFM), A) Después del proceso de producción, B) aspecto del AMFM después de la última pesada, preparados para su limpieza o para ser analizado.

Figura 19: Medición del pH de las tres soluciones tamponadoras y de un control delo largo del tiempo a temperatura variable. Todos los datos por triplicado.

Figura 20. Medición del pH de distintas soluciones tamponadoras usando agua de red, a 20°C. Todos los datos por triplicado.

Figura 21. Microfotografía de la morfología de la superficie del fouling adherido a la superficie metálica. Magnificación a 220x (A) y a 1000x (B).

Figura 22. Vista topografía mediante microscopía confocal óptica de los AMFM. A) Vista 3D de la superficie del fouling lácteo. Los colores cálidos representan los elementos por encima de la media de la superficie. B) Perfil topográfico de los AMFM, resumen de toda la información de altura a lo largo del área analizada. El valor 0 en altura representa la altura media de la superficie del fouling.

Figura 23. Gráfico espectroscópico del EDX-SEM. Escala expresada en kilo-electrón Volts (keV) de la energía emitida durante la excitación mediante rayos X.

Figura 24. Microfotografía de la superficie del modelo de fouling lácteo por microscopía óptica. Magnificación 20X.

Figura 25. Microfotografía de la superficie del modelo de fouling lácteo mediante microscopia DEM. A) Suma de los canales verde (proteínas) y rojo (lípidos). B) Suma de los canales verde (proteínas), azul (azúcares). Magnificación 40x.

Figura 26. Microfotografía de la superficie del modelo de fouling lácteo. A) Suma de los canales verde (proteínas) y azul (azúcares). B) Suma de los canales verde (proteínas), rojo (lípidos) y azul (azúcares). Magnificación 10x.

Figura 27. Representación 3D de un grupo de microfotografías de un AMFM, con 3 μm de diferencia en el plano Z entre tomas. Suma de canales verde (proteínas), rojo (lípidos) y azul (azúcares).

Figura 28. Representación gráfica de la abundancia de los componentes según su intensidad de fluorescencia a lo largo de la profundidad de una muestra por CLSM.

Figura 29. Producto enzimático producido por ITRAM Higiene. Fórmula enzimática bajo el nombre comercial CleanZIP y la solución tamponadora, ENTHALPY Buffer, para la limpieza de la planta piloto.

Figura 30. Esquema del muestreador interno para residuos.

Figura 31. Concentración de residuo seco en las muestras obtenidas durante la limpieza.

Figura 32. Atomizador. A) Después de la producción de leche en polvo. B) Durante el primer enjuague. C) Después de la limpieza enzimática.

Figura 33. Fotografías del PHE (dos zonas distintas) después de la limpieza enzimática. Los círculos rojos indican unas pequeñas acumulaciones de una pasta residual pobremente adherida.

Figura 34. Residuos de fouling. (A) en forma de escamas y secos, después del proceso de limpieza enzimática. B) Escamas residuales una vez carbonizadas para analizar la fracción mineral.

Figura 35. Microfotografía mediante DEM y FITC de las escamas dejadas por el tratamiento enzimático. 10x.

Figura 36. Muestreadores de un pasteurizador. A) Después de 1 h a 105°C, produciéndose fouling lácteo tipo A. B) Después de 4 h a 135°C, produciéndose fouling lácteo tipo B.

Lista de tablas:

Tabla 1: Contenido medio en leche de vaca (Bylund 1995)

Tabla 2: Listado de productos de limpieza empleados en este estudio contra el fouling lácteo y sus condiciones de uso

Tabla 3: Medias del peso acumulado durante la producción de MFM a 0, 4 y 8 h de producción (en gramos) (n=64. Superficies de 25 cm²).

Tabla 4: Productos de limpieza química (CS1) y enzimática (CS8m) usados en este estudio contra el fouling lácteo adaptado.

Tabla 5: Colorantes fluorescentes usados en microscopía de epifluorescencia directa (DEM).

Tabla 6: Composición media de toda la leche cruda de vaca usada para generar fouling lácteo. (n=10, triplicados).

Tabla 7: Medias del peso acumulado en la producción de AMFM a 5 horas de producción (en gramos) (n=125. Superficies de 3.14 cm²).

Tabla 8: Resultados de la fracción inorgánica usando ICP-OES de la leche cruda de vaca, de los modelos de laboratorio de fouling (AMFM) y de los restos de la limpieza química y enzimática, valores en mg/g (n=10 para cada tipo de muestra).

Tabla 9: Media del contenido de cada componente marcado según la intensidad de fluorescencia en porcentaje (%) en distintas muestras de fouling lácteo (n=10 para cada tipo de muestra).

Tabla 10. Eficacia de la eliminación de fouling de los AMFM con dos productos de limpieza distintos.

Tabla 11. Composición aproximada de los componentes de las escamas dejadas por el tratamiento enzimático mediante NIRS (n=3).

Tabla 12. Valores de concentración de los marcadores fluorescentes en las distintas etapas de limpieza del pasteurizador.

Tabla 13. Resultados de los análisis normalizados de CleanZip contra *S. aureus*.

Tabla 14. Resultados de los análisis microbiológicos (UFC/ml) de la limpieza de la planta piloto

Tabla 15. Costes de los productos empleados para los tratamientos de limpieza contra el fouling lácteo A fecha de Octubre de 2016.

I: Introducción

La producción de alimentos procesados requiere un alto grado de higiene en las instalaciones y de buenas prácticas, por parte del personal, para conseguir un producto de calidad y sin riesgos para la salud del consumidor. Para lograr este nivel de limpieza y desinfección. Las tareas de mantenimiento se tienen que programar y organizar de forma periódica, para evitar la acumulación de residuos derivados de la actividad diaria, para evitar la colonización de las superficies e instalaciones por parte de microorganismos (Boyce y cols., 2010, Basso y cols., 2017 y Ríos-Castillo y cols., 2017), que con su presencia, podrían comprometer la viabilidad de los alimentos procesados, alterando su durabilidad o sus propiedades organolépticas, así como por el posible riesgo para la salud. La presencia de patógenos, que pudieran producir una enfermedad de transmisión alimentaria (ETAs) al consumidor, se convertiría en un problema de salud pública, sin un tratamiento adecuado (Ríos-Castillo y cols., 2017).

Dentro de la industria alimentaria, las empresas lecheras son de las que más esfuerzos realizan para mantener las condiciones higiénicas de las instalaciones, dada la problemática específica que tiene el tratamiento térmico de la leche, especialmente, en lo relacionado con el fouling lácteo. La leche ensuciará toda superficie que entre en contacto directo con ella (Visser y Jeurnink. 1997). A mayor temperatura de las superficies o del proceso, a la que se somete la leche, mayor será la cantidad de residuos que se acumularán. Ese residuo proveniente de la leche o fouling lácteo, tiene unas características muy variables, dado que depende, en gran medida, del tipo de tratamiento en el que se originó, de las materias primas de donde provienen los componentes del fouling y otros factores, que pueden influir, como calidad microbiológica de la leche, tipo de material de las superficies, burbujas en el líquido, etc.

La industria lechera debe realizar limpiezas periódicas de sus instalaciones, una vez al día como mínimo, para eliminar los depósitos de fouling de las canalizaciones, depósitos y demás superficies. Estas paradas en la línea de producción pueden llegar a suponer una gran parte de los costes de producción de las empresas. En el caso de la industria lechera, se ha llegado a cifrar el coste de tales actividades en un 80% de todos los costes de producción, debido a la dificultad de eliminación de los residuos (Bansal y Chen. 2006).

Hay varias clasificaciones para definir, en la medida de lo posible, a estos residuos lácteos. Uno de estos sistemas de clasificación se enfoca en la temperatura, a la que se genera el residuo, y las composiciones medias que lo componen. De acuerdo con esta característica, existirían dos tipos de fouling: Fouling lácteo tipo A, producido en procesos térmicos a temperaturas comprendidas entre 75º y 110ºC, con una composición predominantemente orgánica. Fouling tipo B, producido a partir de tratamientos mayores de 110ºC. Este se produciría en esterilizaciones a elevadas temperaturas, como podría ser una esterilización para formulas infantiles. Los residuos, que se adhieren a las superficies, suelen ser mayoritariamente inorgánicos, por las sales precipitadas sobre la maquinaria (Bansal y Chen. 2006; Changani y cols., 1997, de Jong. 1997, Visser y Jeurnink 1997).

Otras clasificaciones se basarían en la mecánica que crea la adhesión del residuo con la superficie, más que en el propio material que lo forma. La cantidad del residuo fijado dependería de si los componentes del residuo se unen más entre sí (**cohesión**), formando agregados de mayor tamaño, de la relación de los elementos con la superficie (**adhesión**) o una mezcla entre adhesión y cohesión. (Fryer y Asteriadou. 2009; Liu y cols., 2006).

El fouling es una problemática conocida desde hace mucho tiempo, dado que su afectación se remonta a los inicios de la industrialización de la producción y distribución de leche (De Schweinitz. 1895).

Su afectación se podría resumir en tres áreas distintas pero interrelacionadas entre sí. Su principal efecto es el de recubrir las superficies en contacto con la leche, como las tuberías o los pasteurizadores. Esto puede provocar una obstrucción de las instalaciones, disparando la presión interna de la maquinaria y llegando a ocluir completamente el paso del líquido. A parte, su presencia puede provocar una incorrecta transmisión del calor, por las propiedades aislantes del fouling lácteo, requiriendo que se aplique más calor al proceso para poder llegar a la temperatura deseada en el centro del líquido tratado, con el consiguiente incremento en el consumo de energía y con una menor eficacia de proceso. Para solucionar estos problemas se tienen que hacer limpiezas periódicas de las instalaciones, de eficacia, en muchas ocasiones, limitada. Durante estas operaciones se consume una gran cantidad de agua, energía, productos químicos de limpieza y tiempo de trabajo de los operarios de planta (Britten y cols., 1988; Boyce y cols., 2010; Hagsten y cols., 2016).

A parte de los efectos operacionales hay efectos sanitarios y de calidad. Como se ha señalado, las propiedades aislantes del fouling hacen que la transmisión del calor, al total del flujo de leche, pueda verse entorpecida. Un tratamiento térmico menor al deseado puede llevar, a que los procesos de rebaja de la carga microbiana o de esterilización, sean deficientes, dando como resultado la presencia de patógenos en el producto final, que puedan ocasionar ETAs a los consumidores, o a la presencia de alteradores, que puedan acortar la vida útil del producto final o alterar sus propiedades organolépticas, aportando propiedades indeseables como color, gusto u olor extraños.

Además, si no se elimina el fouling correctamente de las instalaciones, a diario, se pueden acumular microorganismos que provengan de la instalación y de las materias primas. En caso de colonizar el fouling, este se convertiría en biofouling. Las propiedades aislantes pueden proteger a los microorganismos que albergue en su interior, como si fuera un biofilm. Este biofouling puede actuar de reservorio para patógenos y alterantes, que puedan recontaminar el producto ya tratado. Por esta vía también se puede dañar la calidad final del producto final o permitir ETAs (Bansal y Chen. 2006). Por todo ello, la eliminación de estos residuos y la limpieza y desinfección de las instalaciones, han de formar parte del plan APPCC de las empresas, para controlar y maximizar la calidad de los productos.

Tradicionalmente, para su eliminación, se realizan unos procesos semiempíricos, más basados en la experiencia que en datos reales para su eliminación. Se suelen emplear productos altamente corrosivos para las instalaciones, peligrosos para los operarios y de difícil neutralización para su posterior eliminación. Estos métodos clásicos, se aplican a altas temperaturas y suelen componerse de un tratamiento ácido, típicamente diluciones de ácido nítrico (HNO_3) y de un tratamiento alcalino, basados en sosa cáustica (NaOH). Los tratamientos alcalinos saponifican las grasas presentes en los residuos, cuando la solución se aplica en caliente, y degradan las proteínas. Los tratamientos ácidos tienen una función básicamente desincrustante, sobretodo de los elementos minerales adheridos a las superficies (Bylund. 1995; Graßhoff . 2002).

Otras alternativas para la limpieza, relativamente empleadas a día de hoy, son el empleo de enzimas, proteínas producidas por todos los organismos vivos, que catalizan reacciones químicas. Cada enzima solo cataliza reacciones en un tipo (o grupo reducido) de compuestos químicos (sustrato) (Nelson y Cox. 2014;

Whitehurst y Law. 2009). La máxima actividad catalítica de cada enzima estará en un rango delimitado de ciertos factores ambientales, tales como temperatura, pH, presión o concentración de sustrato. Estos rangos variarán según el origen de la enzima. Al ser de origen biológico, su máxima actividad se correlaciona con el entorno en el que se encuentra el organismo o tejido productor de las enzimas. Hay muchas enzimas, que actúan a temperatura ambiente, proveniente de plantas, enzimas humanas con actividad cercana a los 37°C o enzimas de microorganismos extremófilos, como por ejemplo de las comunidades cercanas a las fumarolas del lecho marino, con actividad a altas temperaturas y pH ácido (Madigan y cols. 2012).

Las interacciones entre las enzimas y su medio físico y químico se pueden calcular con gran precisión (Boyce y cols. 2010; Côlho y cols. 2016). El problema viene de que gran parte de estos cálculos y cinéticas provienen de entornos ideales con una sola enzima con un solo sustrato (Whitehurst y Law. 2009). El comportamiento real de las enzimas, en entornos reales, es mucho menos preciso. Las enzimas no tienen un sustrato único con el que reaccionar, las matrices de los alimentos y los residuos que se derivan de ellos, son una mezcla compleja y heterogénea de compuestos químicos, con concentraciones y propiedades (competidores, inhibidores, pH, etc.) muy distintas de los entornos ideales empleados en el laboratorio. Y a pesar de que, en tecnología de los alimentos, existan nomenclaturas específicas para determinados productos, como pueden ser la proteína de leche o el extracto de carne, la variabilidad entre lotes, puede ser tan grande, que el efecto de una enzima sobre ellos nunca está definido con precisión (Whitehurst y Law. 2009).

A pesar de todo ello, se puede medir la actividad de las enzimas a distintas concentraciones de sustrato (hasta la máxima concentración, a partir de la cual la actividad se estabiliza o disminuye), en función de diferentes factores

ambientales (temperatura, pH u otros). De estos cálculos surgen unas curvas de actividad, de gran utilidad, para predecir el rumbo general que tomará la reacción catalítica, en distintos entornos alimentarios simulados (Whitehurst y Law. 2009). En las curvas de actividad, aparte de revelar el pico donde se dará el máximo de actividad enzimática, también se puede ver de forma fácil la zona o rango en el que la enzima tendrá una actividad elevada, para ese factor ambiental. Teniendo estas informaciones, se puede llegar a formular una mezcla de enzimas que degraden el sustrato que deseemos, en un entorno lo más controlado posible, para que estén dentro de unos rangos deseables y maximizar su actividad (Boyce y cols. 2010).

Por todo ello, se puede llegar a proponer una fórmula, con base enzimática, diseñada para eliminar los residuos que compongan el fouling lácteo y en unas condiciones de trabajo favorables, tanto para las enzimas como para los intereses de las empresas. Mediante esta herramienta, se pretende conseguir un sustituto viable para los tratamientos clásicos de limpieza de las instalaciones de la industria lechera europea, con una efectividad igual o superior a los tratamientos químicos.

Además, también se podrían conseguir otras ventajas con otros factores: un menor consumo de agua para eliminar cualquier riesgo de presencia de sustancias químicas en los sistemas, por donde fluirán alimentos; una eliminación de los residuos más económica, al ser un producto biodegradable y compatible con los sistemas de saneamiento urbanos, sin la necesidad de pasos extras de inactivación o neutralización y una actividad a una menor temperatura, por lo que se conseguirá un ahorro en energía (Boyce y cols. 2010; Graßhoff. 2002, Lequette y cols., 2010; Takahashi y cols., 1996).

II: Objetivos

Los objetivos propuestos para este estudio fueron:

Objetivos principales:

- Desarrollar un modelo de laboratorio, para la formación de fouling lácteo, con la finalidad de ser empleado en pruebas de evaluación de la eficacia de limpiadores industriales eficaces.
- Estudiar la composición del fouling lácteo y los residuos que quedan adheridos a las superficies, después de la limpieza química y enzimática.
- Formular un nuevo producto, basado en enzimas, para asegurar la eliminación del fouling lácteo, con aplicación directa en la industria.

Objetivos específicos:

- Creación de un modelo de laboratorio de fácil realización.
- Diseñar un protocolo de limpieza de fácil aplicación, utilizando el modelo de laboratorio de fouling lácteo.
- Búsqueda de nuevas fórmulas con base enzimática contra fouling lácteo.
- Identificar la evolución del tratamiento de limpieza de los modelos de fouling.
- Uso de la microscopía fluorescente para identificar la composición del fouling y los residuos de la limpieza de forma rápida.
- Análisis cualitativo y cuantitativo de la fracción mineral del fouling lácteo.

- Escalado de la fórmula enzimática y de los protocolos para su uso en planta piloto.
- Ensuciado y limpieza del pasteurizador de la planta piloto para realizar evaluaciones de limpieza química y enzimática.

III: Revisión Bibliográfica

1. Descripción de la materia prima.

La leche es un alimento que ha sido estudiado, científicamente, desde hace más de un siglo. Su estudio, por parte de las universidades y centros de investigación, sólo está por detrás del estudio de las fermentaciones alcohólicas, especialmente con la cerveza y el vino y los estudios microbiológicos e industriales de Louis Pasteur en Francia (Fox y McSweeney. 1998).

Aunque, entre todos los alimentos, es uno de los productos mejor caracterizados químicamente, tiene una complejidad innata debido al gran número de variables que afectan a las características del producto (Bansal y Chen. 2006, de Jong. 1997). De hecho, aún no se conocen en profundidad todas ellas y, aparte de ser consumido de forma directa, sirve como base para una gran variedad de productos, como las leches fermentadas, los quesos y multitud de productos derivados (Fox y McSweeney. 1998).

La leche es un producto que sólo producen las hembras de todas las especies de mamíferos para alimentar a su descendencia neonata y cubrir sus necesidades fisiológicas. Actualmente existen más de 5.400 especies distintas de mamíferos, siendo esta una estimación muy conservadora (Martins. 2011).

Este alimento es un fluido biológico complejo, muy variable entre especies y dentro de ellas. Las diferencias, que pueden afectar a la composición de la leche dentro de una misma especie animal, pueden depender de las variedades seleccionadas, dentro de una misma raza, para una mayor producción lechera, su estado de salud, la alimentación del animal, la época del año, el tiempo transcurrido desde el parto, la frecuencia entre ordeñados, la edad del animal y el propio animal, de forma individual, entre otros factores relacionados con sus

características (Bansal y Chen. 2006, de Jong. 1997, Fox y McSweeney. 1998. Jimenez y cols. 2013).

Muchas de estas diferencias, una vez recolectada toda la leche de un rebaño, se ajustan, primero por la mezcla de toda la leche de un rebaño en un solo tanque y, posteriormente, mediante procesos tecnológicos, como el desnatado, para ajustar la cantidad de grasa en la leche líquida comercial. La composición de la leche depende de cada especie. Estas diferencias se deben entre otros factores, a la adaptación de la composición a las necesidades específicas para el correcto desarrollo de las crías de cada especie de mamífero.

La leche se puede dividir en tres fases diferenciadas entre sí, la suspensión, la solución y la emulsión. (Fox y McSweeney. 1998). En suspensión se encuentran las proteínas del suero, como las lactoglobulinas o las inmunoglobulinas. La parte acuosa contendría, entre los compuestos en solución, como es el caso de las vitaminas hidrosolubles, sales minerales y los azúcares, mayoritariamente lactosa, un disacárido formado por una glucosa y una galactosa, unidos por un enlace 1-4 (Fox y McSweeney. 1998). En la fase micelar existe una emulsión de proteínas, compuestas mayoritariamente por caseínas (α , β y κ), junto al calcio y lípidos. Los diámetros y componentes de estas micelas tienen una gran importancia a la hora de estudiar las características de la leche y la especie de origen (Fox y McSweeney. 1998). Todas esas tres fases forman un sistema dinámico, por la inestabilidad de ciertas estructuras, como por ejemplo la precipitación de sales minerales; pero también por la presencia de enzimas en la leche, que pueden modificar algunos de sus componentes.

También hay factores externos, a la propia leche, que modifican el sistema, como la presencia y crecimiento de microorganismos, la aplicación de procesos

tecnológicos, como agitación y refrigeración, o tratamientos térmicos para su conservación, como la pasteurización (de Jong. 1997; Fox y McSweeney. 1998; Westhoff. 1978).

Tabla 1: Contenido medio en leche de vaca (Bylund 1995)

Componente	Concentración Media (%)
Agua	87,50
Sólidos totales	13,00
Lactosa	4,80
Minerales	0,80
Grasa	3,90
Proteínas	3,40
Caseína	2,60
β-Lactoglobulina	0,32
α-Lactalbumina	0,12

2. Breve reseña histórica de los inicios del consumo de leche.

La leche y los productos lácteos derivados han sido un elemento importante, desde hace milenios, para las poblaciones humanas. El consumo de leche de animales domesticados, por parte del *Homo sapiens*, se ha identificado entre 8.500 y 8.000 años a.C., en los inicios de la revolución agrícola (Fox y McSweeney. 1998). Incluso se discute si la producción de leche pudo ser uno de los desencadenantes de la domesticación del ganado, en la región de Oriente Medio (Spiteri y cols. 2016). La creencia general es que primero se domesticaron los rumiantes ovinos y caprinos y mucho más tarde los bovinos, que con el tiempo pasarían a ser la especie predominante, en zonas predominantemente ganaderas, para garantizar la producción de leche (Fox y McSweeney. 1998).

En Europa, los primeros indicios aparecen en las primeras etapas del neolítico, entre 7.000 y 5.000 años a. C., en las costas del Mediterráneo. El origen de la domesticación se produjo en el extremo más oriental y se fue expandiendo, mediante la creación de nuevos asentamientos formados por colonos, en las costas de poniente. La dispersión se vio favorecida por los primeros exploradores marinos (Reingruber. 2011).

En los asentamientos analizados, de los pobladores de la costa norte del Mediterráneo, se han conservado pocos elementos, entre los pocos restos identificados y datados, se encuentran fragmentos de cerámica y restos óseos de los animales sacrificados para alimentación. Los fragmentos de cerámica, para cocinar y almacenaje, contienen indicios del uso de leche y derivados lácteos, por los restos lipídicos adheridos a sus superficies. De los fragmentos óseos encontrados se puede extrapolar la raza del animal y la edad, en el

momento de su sacrificio. Estos datos ayudan a diferenciar las producciones ganaderas para la producción de carne, de las producciones de carne y leche. Las comunidades con acceso a estos nuevos productos tuvieron una mayor expansión, al tener acceso a una fuente sostenible de alimento de origen animal (Castagnino y Flavia. 2011).

El uso de rebaños de rumiantes para la producción de leche, habría ayudado a la extensión de nuevas comunidades, sobretodo en ambientes difíciles, como pudieran ser ciertas islas griegas. Los rebaños de cabras pudieron adaptarse mejor, a zonas marginales, que otras especies ganaderas contemporáneas, y pudieron proveer de una fuente de proteínas estable, a los pobladores neolíticos, de estas zonas áridas. La domesticación de ganado para la producción de leche, ha tenido un impacto social, cultural y económico muy importante en las poblaciones europeas. El consumo extendido de productos lácteos, ayudó a la extensión del alelo que codifica la producción de lactasa en adultos, lo que supone una ventaja nutricional para las poblaciones europeas (neolítico tardío) (Itan y cols. 2009).

En España, hasta el primer tercio del siglo XX, no se extendió el consumo de leche fresca en la población española, hecho dado por las mejoras técnicas de conservación, el aumento de la producción, el aumento de la renta per cápita, el cambio en las costumbres de consumo y una mejora de la imagen social del consumo de leche. Además, habría que destacar el apoyo de instituciones públicas, para la mejora de la calidad de la dieta, y las políticas activas para impulsar su consumo (Nos y Pujol. 2006; Collantes 2014). Esta situación cambió después de la Guerra Civil española, con una destacada bajada del consumo, a raíz de la disminución de la renta y del aumento de las desigualdades económicas. No volvió a observarse un aumento hasta mediados de los años 50, que se ha mantenido hasta el inicio del S. XXI.

3. Tecnificación de los tratamientos de la leche.

La producción de leche, en sus inicios, fue de forma local y estacional, dado el carácter perecedero de este alimento y que la producción está ligada a que la hembra tenga crías. Sólo se podía consumir de forma fresca o como alguno de sus derivados, especialmente como leches ácidas o queso (Fox y McSweeney. 1998).

La conservación de alimentos mediante calor puede haber sido una de las tecnologías más antiguas aplicadas por la humanidad, partiendo del necesario dominio previo del fuego (Sarg. 1896). Hay referencias antiguas donde se describe que los hogares recurrían a la cocción de los alimentos o a hervir la leche, para alargar su vida útil. Es cierto que se desconocía el mecanismo involucrado en la conservación del alimento, incluso hoy en día hay muchas personas que desconocen qué es la pasteurización; sin embargo, se ha seguido aplicando el calor, en entornos donde la pasteurización industrial no fue implementada (Collantes. 2014; Hall y Trout. 1968).

Hasta que no se desarrollaron nuevos sistemas de transporte para mercancías, donde se acortaron los tiempos de transporte, entre los lugares de producción y nuevos focos de consumidores, y la consiguiente aparición de sistemas de refrigeración, para alargar las condiciones óptimas de los alimentos, el consumo de leche fresca no se extendió (Nos y Pujol. 2006). Sin embargo, no se logró extender el consumo de forma masiva e industrializar el sector lechero hasta el desarrollo de sistemas de higienización, mediante tratamientos térmicos (Collantes. 2014; Nos y Pujol. 2006). Muchas sustancias, como la leche u otros alimentos, son tratados mediante calor de manera controlada, por debajo del punto de ebullición del agua. Esto se debe a que el tratamiento térmico

(termización) disminuye la carga microbiana del producto y, en consecuencia, alarga la vida útil del producto (Fox y McSweeney. 1998).

A partir de ese concepto se deriva el proceso llamado pasteurización, que recibe el nombre en honor al químico francés Louis Pasteur. Este proceso fue aplicado por primera vez en 1860, en la industria vinícola francesa, que sufría importantes pérdidas en la producción, por la presencia de bacterias del ácido láctico y bacterias del ácido acético, que agriaban el vino. Pasteur, mediante un proceso térmico controlado, pudo evitar el deterioro de las propiedades organolépticas del producto y alargar su vida útil, al rebajar la carga microbiana y destruir los microorganismos alterantes. La pasteurización no puede considerarse como un método de esterilización, al no eliminar todas las formas de vida microscópicas del alimento. (Willey y cols. 2009). La pasteurización, como objetivo, tiene la eliminación de patógenos y la reducción de la carga microbiana total, también logra inactivar ciertas enzimas que en estado funcional, degradarían el alimento (Fox y McSweeney. 1998).

Pero hasta 1886 no se adaptó esta tecnología para el procesado de leche cruda, evitando muchas enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs), esta adaptación vino de la mano de los químicos alemanes V.H. y F. Soxhlet. El éxito de esta tecnología hizo que se expandiera su uso por Europa y se introdujera la pasteurización en E.E.U.U. a partir de 1889. Desde entonces se sigue aplicando, a nivel mundial, para tratar leche y otros alimentos (Westhoff. 1978; Willey y cols. 2009).

Los microorganismos patógenos, capaces de producir ETAs a partir del consumo de leche, han sido ampliamente controlados en países desarrollados, gracias a los procedimientos de pasteurización y esterilización (Westhoff. 1978), haciendo de ellos un peligro menor y, en algunos casos, desapareciendo del panorama de

enfermedades declaradas. Entre los patógenos eliminados podemos encontrar a *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis humana) y *M. bovis* (tuberculosis bovina), *Brucella. sp* (brucelosis), *Coxiella burnetii* (fiebre Q), *Salmonella enterica* sub. *enterica* serotipos Typhi o Paratyphi (fiebre tifoidea), *Listeria monocytogenes* (listeriosis), *Campylobacter. sp* (campilobacteriosis), *Salmonella. sp* (salmonelosis) o *Escherichia coli* O157:H7 (diarrea hemorrágica) (Madigan y cols. 2012)

Los tratamientos de UHT y el envasado aséptico comenzaron en España en los años 60, revolucionando el sector y haciendo subir las cifras de consumo de leche por cápita de 60 a 85 litros por persona y año (Anónimo, 2014). La implantación de estas tecnologías permitió el acceso de este producto, no perecedero, a muchas zonas remotas, dado que ya no requería mantener la cadena de frío durante toda su vida útil. Actualmente, en España, con datos de 2016, el Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Anónimo, 2016) cuantificó que el 96,5% de la leche líquida consumida en España es de larga duración (UHT o esterilizada).

3.1. Tratamientos por calor más frecuentes.

Hay distintos tipos de tratamientos térmicos, cada uno de ellos se diferencia en función del par de tiempo y temperatura empleada en el tratamiento térmico. Cada uno con sus características ideales para distintos productos, entornos o sociedades (Westhoff. 1978). En la leche se empleó durante mucho tiempo la destrucción del bacilo de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) como marcador, para determinar la pareja tiempo-temperatura precisa para la pasteurización efectiva de la leche. La problemática radicó en la disparidad de estudios, donde se demostraba la erradicación de *M. tuberculosis*, con una variedad de equipos y

parejas tiempo-temperatura muy amplia; muchas veces con valores seleccionados de forma arbitraria. El objetivo primordial era la seguridad del alimento, con lo que se solían exceder las duraciones del tratamiento y las temperaturas. Sin embargo, no se tenía tanto en cuenta las calidades nutricional y organoléptica (Westhoff. 1978). A esta problemática se añadió la de la calidad y durabilidad de la leche. La leche pasteurizada tiene una durabilidad comercial corta (de unos días a alguna semana), mientras que la demanda de la población ha tendido a que la leche pueda durar meses. Por ello, a la pasteurización se añadieron los tratamientos de esterilización, con el objetivo de mantener la composición nutricional original de la leche durante meses, garantizando la calidad y seguridad del producto.

Aquí se describen algunos de los sistemas más utilizados para tratar la leche por calor, en la industria láctea:

- LTH: En la pasteurización a baja temperatura o pasteurización **vat**, el producto se mantiene a 62,8°C durante 30 minutos en un depósito, donde una vez terminado el proceso, se deja enfriar la leche de forma lenta.
- HTSH: En la pasteurización a alta temperatura y corta duración o **flash**, el producto se mantiene 71-72°C durante 15 segundos. Esta forma de pasteurización generó muchos detractores, sobretodo en sus inicios, frente a la LTH por parte de los colectivos sanitarios, por miedo a que no eliminara los patógenos que pudieran provocar ETAs como *M. tuberculosis* (Westhoff, D.C. 1978).
- HHST: En la pasteurización a alta temperatura y tiempo acortado, el producto se puede someter a distintos pares temperatura-tiempo, desde 89°C durante 1 segundo a 100°C durante 0,01 segundos (Anónimo, 2017).

- UP: En la ultra pasteurización, el producto se somete a un tratamiento de 138°C durante 2 segundos (Anónimo, 2017).
- UHT: En este tipo de esterilización de la leche, se puede tratar a temperatura ultra-elevada durante un breve período de tiempo. Un ejemplo habitual es aplicar una temperatura de 141°C durante 2 segundos y embotellado, posteriormente, en envases asépticos. Se considera una esterilización comercial. Esto se debe a que no se erradican la totalidad de los microorganismos, pero se impide su capacidad de multiplicación (Holsinger y cols. 1997).

Como podemos ver, la tendencia es aplicar altas temperaturas durante el menor tiempo posible, esto se debe a que, en estas condiciones, se consigue una eficacia microbicida comercial y, al mismo tiempo, se reduce la merma de calidad por el proceso térmico en el producto final (Willey y cols. 2009). La elección se realiza en función del acceso a la tecnología y el gusto de los consumidores por un determinado producto.

3.2. Otros sistemas de conservación.

En los últimos 100 años, a partir de la producción de leche segura y de mayor duración, se han podido desarrollar una gran variedad de productos lácteos diferentes. De entre ellos, los más importantes son los fraccionados de origen lácteo, como lactosa, grasas de la leche o las proteínas lácteas. Gracias a técnicas como la microfiltración, con distinto tamaño de poro, se pueden llegar a separar casi todos los componentes de la leche (Brans y cols. 2004). También podemos encontrar los alimentos con nuevas características añadidas, como los

alimentos funcionales o los ricos en prebióticos o probióticos (Fox y McSweeney. 1998).

Además, como sistema mixto, se han desarrollado productos donde se elimina la mayor cantidad de agua del producto final, reduciendo la actividad de agua y alargando la vida útil. Ejemplos destacados son la leche evaporada, donde se elimina hasta el 60% de contenido de agua, o la producción de leche en polvo por atomización, con una reducción superior al 90% en contenido de agua. Esto se consiguió gracias a la patente de Robert Stauf en 1901 (Fleming., 1921).

Otros sistemas fuera de los tratamientos térmicos para aumentar la seguridad y la vida útil de la leche líquida, estos sistemas se aplican sobre todo para productos termosensibles o para evitar la merma de ciertos nutrientes o características organolépticas.

- Microfiltración: Proceso basado en el empleo de membranas para separar los elementos de la leche en distintas fracciones. Con un diámetro de poro de 1 μm se pueden eliminar bacterias y esporas de la leche (Brans y cols. 2004).
- Clarificación: Sistema empleado para la eliminación de sólidos, arrastrados durante el ordeño usando la fuerza centrífuga para separar por densidad las partículas de la leche. Mediante este sistema se protege el producto final y las instalaciones de tratamiento de residuos no deseados. También se puede eliminar leucocitos y bacterias mediante este sistema (Anónimo B, 2017).
- Bactofugación: Centrifugación diseñada para separar los microorganismos, sobre todo las esporas bacterianas, mucho más densas que las células vegetativas presentes en la leche líquida, y así alargar la vida útil del producto final (Stack y Sillen. 1998).

- Química: Tratamiento empleado, sobre todo, en países en vías de desarrollo. Se basa en el empleo de productos químicos, como el peróxido de hidrógeno, por la carencia de medios económicos o tecnológicos, necesarios para aplicar otros sistemas de conservación (Barabás. 1995).

4. Ensuciamiento de las superficies.

4.1. Biofilms.

Son una bioestructura generada por una o varias especies microbianas (los biofilms mixtos son los más comunes), haciendo de la vida sésil una de las formas de vida más extendidas y típicas en todos los ambientes, tanto naturales como artificiales (Sutherland. 2001). Pueden encontrarse biofilms tanto en la interfase entre sólido-líquido, solido-aire o aire-líquido. (Costerton y cols. 1987).

Esta forma de vida, tan extendida, se puede remontar a hace 3.700 millones de años, en el registro fósil en forma de estromatolitos, acumulaciones sucesivas de biofilms calcificados (Nutman y cols., 2016). Actualmente se ha determinado que el 99% de los microorganismos en la Tierra viven de este modo, siendo responsables en parte de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y de la mayoría de los metales (Flemming. 2002).

Los microorganismos, junto con líquidos que contengan nutrientes, en contacto con una superficie, se adhieren empleando proteínas de superficie en primera instancia. A partir de ese momento, se desencadenará una cadena de activación de genes para la formación del biofilm, muchos de los cuales, al activar la

promoción de la formación del biofilm, inhibirán los genes promotores de la vida planctónica o libre (Kolter y Greenberg. 2006). Una vez ha ocurrido la primera adhesión sobre una superficie, aparecen agregados celulares o microcolonias en la superficie. Las células excretan al exterior todo tipo de productos, en gran parte polisacárido extracelular o exopolisacárido (EPS), proteínas extracelulares de diversa función, DNA extracelular, tanto de lisis celular como excretado activamente y otros componentes disueltos en la matriz, que hasta el 97%, se compondrá de agua. Esta matriz hidratada ayudaría a mantener la humedad en condiciones adversas para los microorganismos (Zhang y cols. 1998, Sutherland. 2001).

La forma de las estructuras y los componentes, presentes en cada biofilm, son una mezcla única de factores, dado que la generación del biofilm está muy influenciada por el entorno, como los nutrientes, las especies que lo crean, las demás especies que puedan interactuar con el biofilm o posteriores colonizadores de la estructura, una vez ya ha sido generada. Por tanto, cada biofilm sería único en función de las condiciones y el entorno en que se generó (Sutherland. 2001).

Los microorganismos, que viven en este tipo de asociación, tienen una serie de ventajas respecto a la vida planctónica. Los beneficios para la formación de biofilms serían: la defensa contra condiciones adversas, como evitar el contacto con tóxicos, con la creación de gradientes de concentración de compuestos perjudiciales, o dificultando el acceso a organismos, que se alimenten por fagocitosis, de los residentes del biofilm. La matriz de EPS retiene los componentes de células lisadas y de exoenzimas liberadas al medio o la movilización de sustancias a través de los canales internos de la estructura. La acumulación de ADN ocasiona una mayor transferencia horizontal de genes entre microorganismos. La matriz absorbe nutrientes del medio y retiene agua

para evitar la deshidratación. Es posible la transmisión de la luz a las capas internas, creando un gradiente de luz, muy útil para biofilms estratificados, donde los fotosintéticos, que necesiten mayor insolación, se sitúen en las capas externas y, los que necesiten menos luz, en las capas internas (Flemming. 2002; Jefferson. 2004).

Los biofilms se extienden, creciendo en las tres dimensiones en el lugar donde está adherida la bioestructura; pero también se extienden al romperse fragmentos del biofilm con células vegetativas o esporas, que se moverán con la corriente de líquido que hidrata y aporta nutrientes a la comunidad (Hinton y cols. 2001).

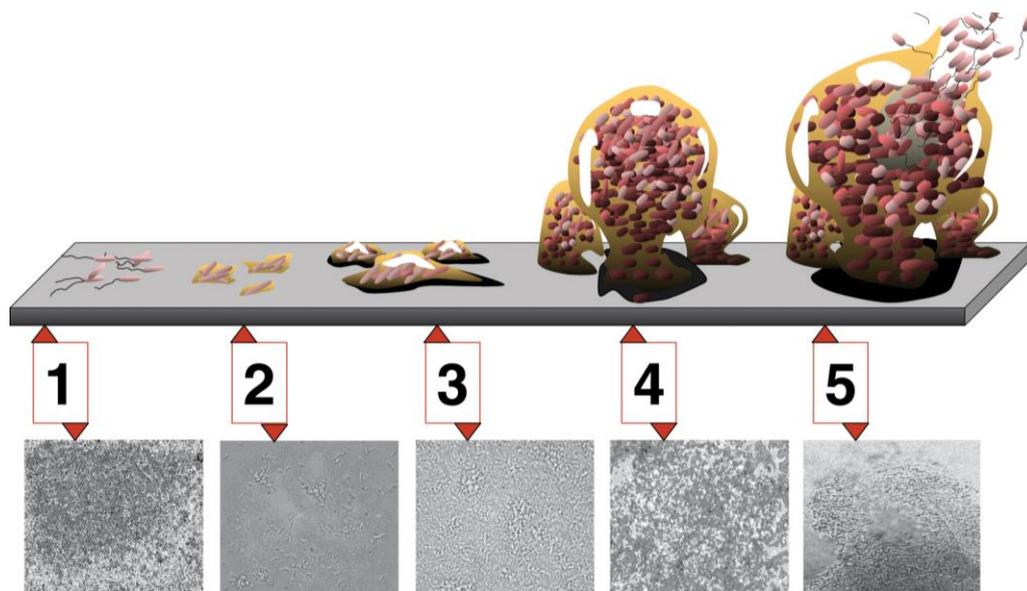


Figura 1: Las cinco etapas del desarrollo de un biofilm. 1) primer contacto de las células con la superficie 2) adhesión irreversible 3) maduración formando agregados celulares 4) maduración produciendo una matriz alrededor de las células 5) dispersión. Cada fase está relacionada con una microfotografía de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (credito de la imagen D. Davis, (Monroe. 2007))

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms microbianos. Esto supone un gran coste económico para las empresas, por la contaminación de las materias primas y los alimentos procesados, por parte de

microorganismos alterantes o de patógenos, procedentes de las superficies. La contaminación de los equipos y las instalaciones se ha relacionado con el 40% de las ETAs bacterianas en Francia (Haeghebaert y cols. 2001).

Sin embargo, a pesar de todas las barreras tecnológicas, es imposible procesar alimentos sin ningún contenido en microorganismos, dada la ubicuidad de microorganismos y, especialmente, por la resistencia de los biofilms para ser eliminados. Sólo es posible si existe una etapa de esterilización completa (Brooks y Flint. 2008), algo que ya hemos comentado que incluso es muy complicado hoy en día.

4.2. Fouling.

Este término se acuñó originalmente por los usuarios de la tecnología de intercambiadores de calor en placas (PHE), definiéndola como la deposición de materia no deseada en una superficie (Epstein. 1981)

El fouling incluye diferentes tipos de residuos (Flemming. 2002):

- Depósitos de sales minerales,
- Depósitos de sustancias orgánicas,
- Depósitos de partículas,
- Depósitos de biofouling.

El fouling o ensuciamiento, es un concepto que engloba actualmente a una gran variedad de sustancias indeseadas y adheridas sobre superficies de interés. Éste causa un perjuicio importante, puesto que es necesario eliminar esas sustancias

adheridas, para poder asegurar los tratamientos programados. Las superficies se ensucian por la adhesión, de forma pasiva o activa, de compuestos que entren en contacto con la superficie de interés. Los elementos depositados dependerán cuantitativamente, del contenido de esos elementos en el líquido en contacto con la superficie y, para su control, sólo ha de ser eliminado el elemento adherente del líquido en contacto con la superficie (Flemming. 2002).

La presencia de estos compuestos puede producir distintos grados de afectación en la superficie recubierta. Los problemas derivados de estos elementos adheridos dependen, en gran medida, de varios factores, como la masividad de la extensión afectada, del uso que tenga la superficie o de si se producen daños en la propia superficie por la presencia de estos elementos.

Como se desglosa en la revisión de Bansal y Chen (2006), no sólo los compuestos que forman el fouling intervienen en este proceso. Las propiedades de la superficie ensuciada y el proceso que se aplica, juegan un papel clave en la formación de estos depósitos de residuos. Entre otros muchos factores que pueden afectar a la formación del fouling, hay que destacar: a) La rugosidad o irregularidades, b) la hidrofobicidad de la superficie, c) el material base utilizado para la superficie, d) tratamientos anti-fouling y recubrimientos, e) contenido en aire o burbujas, f) las turbulencias, g) la temperatura de la superficie, h) la presencia de antiguos residuos no eliminados, i) la presencia de microorganismos y j) el tipo de proceso para aplicar calor al producto a tratar.

Todo el proceso de formación del fouling se compone de un gran conjunto de reacciones fisicoquímicas, donde se puede incidir en ciertos puntos, a lo largo de todo el proceso, para mitigar o evitar la adhesión del fouling sobre la superficie, como podría ser el uso de recubrimientos antifouling sobre la superficie de interés (Bansal y Chen. 2006; de Jong. 1997; Foster y cols. 1989).

Las propiedades físicas de los depósitos, como de las superficies, afectarán a la creación del fouling. El fouling se formará por fuerzas de adhesión y cohesión (Liu y cols. 2006). Los factores que contribuyen a la adhesión de los residuos a la superficie serían fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas y el efecto de contacto del área: a mayor área, mayores fuerzas de atracción (Bott. 1995).

Todo ello es importante, dado que, si se entiende qué fuerzas mantienen unido a los depósitos de residuos en las superficies, se podrá mejorar el proceso de eliminación del fouling sobre ellas. Estos residuos depositados se pueden dar, tanto por adhesión a la superficie, como por cohesión entre los distintos elementos del fouling o por una mezcla de las dos reacciones en distinto grado. La limpieza se puede dar tanto para romper las fuerzas de la adhesión, como de la cohesión de los residuos (Liu y cols. 2006).

La fuerza de los elementos en el fouling depende del tipo de material que lo forma. Residuos covalentemente adheridos a la superficie son los residuos proteicos, como un derivado lácteo o un derivado de huevo. Un residuo agregado entre sí se encuentra en ciertos polímeros naturales gelificados. La interacción entre los residuos y la superficie también es crítica, para garantizar su eliminación (Liu y cols. 2006).

Por ello, se ha estudiado ampliamente la influencia de la energía de superficie y la adhesión del fouling. La relación entre la energía de superficie de los materiales y la adhesión, se representa mediante la curva de Baier (Figura 2); para predecir la formación del fouling en áreas como oceanografía o biomedicina (Baier. 1980).

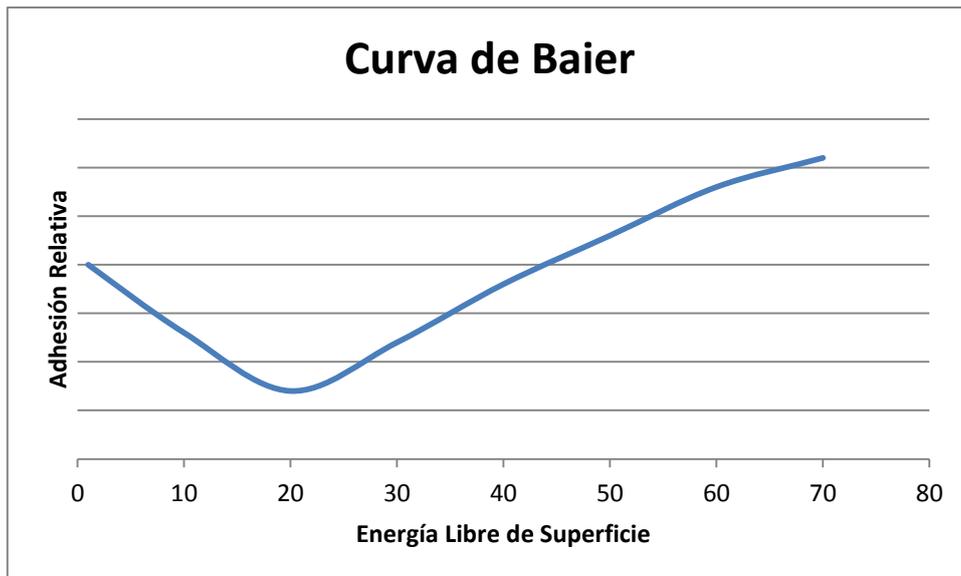


Figura 2. Curva de la relación empírica entre energía libre de superficie y la bioadhesión relativa (Representación basada en Brady. 1999)

El valor mínimo de tensión superficial o energía de superficie, en el que se forma fouling, está comprendido entre 22 y 24 mN/m. Este valor representa la mínima dificultad del agua para humectar la superficie, cuando se eliminan los residuos adheridos (Magin y cols. 2010).

Las interacciones, que requieren altas energías de superficie, para unir partículas a un sustrato, son enlaces covalentes, iónicos o metálicos. Para sustratos de baja energía superficial, la adhesión se produce mediante fuerzas de Van der Waals o puentes de hidrógeno. Las superficies con alta energía superficial son más fácilmente humectables (Gennes. 1985).

Por ejemplo, los microorganismos se adhieren a una superficie de interés, siempre que sea termodinámicamente favorable la reacción, que es cuando la energía libre total de adhesión sea negativa. Por lo que tanto, si se modifican las cargas de la superficie, se pueden repeler la contaminación bacteriana, dado que su carga neta de superficie celular es negativa (Teixeira y cols. 2005).

Es importante tener en cuenta que la adhesión no se da por un solo mecanismo, sobre todo cuando intervienen organismos o materia orgánica, que pueden tener más de un sistema de adhesión o posibilidades de crear distintos enlaces con la superficie de interés (Brady. 1999). Por este motivo,

Muchos sistemas antifouling, como recubrimientos o pinturas, tratan de modificar estos valores para dificultar, en la medida de lo posible, la adhesión (Britten y cols. 1988; Fitridge y cols. 2012).

4.3. Biofouling.

El biofouling es un término muy interrelacionado con el de fouling, dado que, en muy pocos ambientes naturales, se dará uno sin el otro. El biofouling sólo se da en superficies de interés, como puede ser un PHE o la quilla de un barco. Si en la superficie no existe ningún tipo de afección o perjuicio por la presencia del biofouling, ese ensuciamiento no recibiría ese nombre y solo sería suciedad adherida.

La aparición de biofouling viene ligada al desarrollo de tapices microbianos (biofilms) que, a continuación, irán desarrollando y acumulando elementos del medio circundante, creando los depósitos de residuos o elementos no deseados, en la superficie.

Una alternativa para la aparición de biofouling se daría en ciertas situaciones, como en el interior de PHE, donde se podría acumular primero una capa de materia no deseada (tanto orgánica como inorgánica) y que *a posteriori* sería colonizada por microorganismos, que utilizarían ese fouling como sustrato para adherirse y proliferar en la superficie de forma más eficaz. De esta colonización

obtienen beneficios parecidos a los de formar un biofilm, antes de formarlo como tal. El desarrollo del biofouling puede promover otras colonizaciones posteriores, añadiendo otros efectos indeseables, como corrosión de materiales, atasco de canalizaciones para líquidos y la degradación general de los objetos y superficies afectadas (Madigan y cols. 2012).

Estas estructuras pueden desarrollar una compleja comunidad, que englobará desde microorganismos, como bacterias o diatomeas, a macroorganismos, como moluscos o algas. En muchos casos los organismos adheridos son heterotróficos, obteniendo nutrientes de la materia orgánica disuelta y transformándola en biomasa localizada. Puede que esos nutrientes no formen parte del fouling directamente, pero lo hacen de forma indirecta. Típicamente, los sistemas antibiofouling suelen centrarse en eliminar los microorganismos, en vez de explotar otras estrategias como podría ser limitar el acceso a nutrientes por parte de los microorganismos (Flemming. 2002) o impedir su adhesión (Barish y Goddard. 2013; Fitridge y cols., 2012).

Como ya se ha mencionado anteriormente, muy pocos procesos tecnológicos están libres de la presencia de microorganismos y biofilms. Por lo que la presencia de nutrientes podrá desembocar en una mayor biomasa microbiana, tanto en el caso de productos orgánicos (heterotróficos) como inorgánicos (litotróficos), por lo que cualquier elemento biotransformable ha de ser controlado. Uno de los ejemplos más claros de factores a controlar, para evitar los daños por biofouling, es la limitación del acceso a la luz, para prevenir la aparición de organismos fotosintéticos, el crecimiento de cianobacterias y otras microalgas. Es frecuente la aparición de biofouling fotosintético en instalaciones de refrigeración, donde su acumulación puede llegar a destruir el sistema de refrigeración. Esto provoca problemas a nivel del sistema averiado y del resto de

la instalación, que se controla por el sistema de frío (Characklis. 1990; Straub y cols. 2001).

Otro ejemplo, alejado del objeto de nuestro estudio, es todo lo que afecta a la conservación de obras históricas y de arte, donde la aparición de microorganismos fotosintéticos, a causa de la humedad y los sistemas de iluminación artificial, ha provocado serios daños. Un ejemplo claro es el de las pinturas rupestres deterioradas, de la cueva francesa de Lascaux (19.000 – 15.000 años de antigüedad) (Ciferri. 1999).



Figura 3. Perfil vertical de un tapete microbiano, estructura generada por la sucesión de comunidades microbianas y biofilms adaptadas a distintos entornos. (Madigan y cols. 2012)

Normalmente, las especies residentes en el biofouling consistirán en la microbiota autóctona, pero variará especialmente en las distintas partes del fouling, por los distintos ambientes que se puedan dar y por la susceptibilidad a tóxicos y biocidas de los microorganismos, en cada zona de la estructura (Flemming. 2002). En la anterior figura (Figura 3) por ejemplo, las capas más

internas de los tapetes microbianos pueden estar dominadas por poblaciones de bacterias reductoras del azufre, bacterias anaerobias estrictas, que basan su respiración en reducir azufre (S) y generar ácido sulfhídrico (H₂S), culpable de biocorrosión en superficies metálicas (Beech y Sunner. 2004; Madigan y col. 2012). Sin embargo, en las capas superficiales, la microbiota estará compuesta de microorganismos aeróbicos y productores de oxígeno.

5. Sectores afectados.

Hay una gran variedad de sectores afectados por la presencia de fouling o biofouling en las instalaciones y la maquinaria. Cada sector estará afectado con distinta severidad y de formas muy distintas, dependiendo de sus características y de la calidad de los residuos que se adhieran a las superficies. Entre los casos más leves podemos encontrar la industria petroquímica. Este tipo de industria ha de llevar a cabo una limpieza de las instalaciones de forma anual. Estas instalaciones, por donde fluye el petróleo y sus derivados, van acumulando de forma lenta fouling, que puede llegar a obstruir las canalizaciones (Jimenez y cols. 2013). Para su eliminación se suelen emplear disolventes como el xileno (dimetilbenceno) para solubilizar los residuos orgánicos adheridos.

En las plantas de tratamiento de aguas residuales y de depuración existe una gran cantidad de fouling y biofouling. En las instalaciones que usen membranas de filtración para tratar las aguas, tienen una gran adhesión de residuos y microorganismos en la superficie de las membranas, lo que obstruye los poros por donde fluye el agua y puede paralizar la actividad de la planta (Doumèche y cols., 2007; Porcelli y Judd, 2010; Kwan y cols., 2015). Los tratamientos, mediante productos químicos, para eliminar estos elementos, tradicionalmente se han basado en el empleo de productos corrosivos para las membranas. Esto conlleva una reducción de su vida útil, provocando un sobre coste en la

utilización de esta tecnología (Argüello y cols. 2003 y 2005; D'souza y Mawson, 2005). Esto está llevando al desarrollo de otros sistemas de limpieza que reduzcan los costes de mantenimiento de la instalación (Argüello y col. 2003; D'souza y Mawson, 2005).

Un ejemplo muy específico donde el biofouling puede tener una gran afectación es en los sistemas de agua sanitaria y aguas negras de las naves o estaciones espaciales. Donde se mueven los líquidos mediante capilaridad y existen muchas etapas de filtración y ósmosis, donde el crecimiento de biofilms, foulings minerales o biofoulings puede causar un gran impacto, por las limitaciones técnicas para eliminarlos sin dañar la instalación (Thomas y cols. 2010).

Sin embargo, las industrias más afectadas por este fenómeno son las radicadas en el medio marino. En el caso de la industria naval, los navíos y otras instalaciones marinas sufren una acumulación constante, sobre todo de una gran variedad de organismos, en las superficies sumergidas de este sector. El crecimiento de organismos, como lapas (*Patella vulgata*) o bellotas de mar (*Balanus sp*), aumentan la resistencia de la embarcación al moverse por el agua, aumentando el peso de la estructura y la resistencia al desplazamiento. En consecuencia, se incrementa significativamente el consumo de combustible (menor eficacia) para lograr la misma velocidad, que respecto al estado de fábrica de la embarcación. Además, el aumento, de hasta un 30%, en el consumo de combustible, provoca un aumento en la emisión de gases de efecto invernadero (Brady. 1999). Aparte de la afectación económica y mecánica, también tiene consecuencias medioambientales por la exportación de especies foráneas a nuevas localizaciones, donde puedan no tener depredadores naturales, y unas condiciones para su desarrollo parecidas a su lugar de origen. Estas especies invasoras pueden llegar a tener un increíble impacto en el

ecosistema y alterar de forma indirecta otras actividades económicas y sectores productivos.

Para evitar tales afectaciones, existen una gran variedad de estrategias, como puede ser los recubrimientos y pinturas antifouling o las limpiezas en el dique seco. Tales acciones comportan un importante coste económico, aparte de la posibilidad de contaminar el medio ambiente, sobre todo por los tóxicos embebidos en los recubrimientos y pinturas antifouling, para retrasar la adhesión de los organismos a la superficie tratada. Esta tecnología ya era empleada en la Edad Media para evitar el fouling en la quilla de sus barcos, cubriendo la quilla con sustancias tóxicas como cobre o derivados de este metal (Brady. 1999; Coutts y Taylor. 2004; Dobretsov y cols. 2013; Flemming. 2002).

De manera similar, en la acuicultura, el biofouling adherido a las estructuras artificiales y a los organismos cultivados, es responsable de entre un 5% y un 10% los costes productivos a nivel mundial en esta industria (Fitridge y col. 2012).

En la industria alimentaria, el procesado de alimentos genera una gran cantidad de residuos. Los alimentos proporcionan un entorno ideal para la proliferación de microorganismos alterantes y patógenos, sobretodo en forma de biofilms y biofouling. Este problema afecta a la producción de alimentos, tanto a su calidad como a la seguridad de los mismos para el consumidor. En consecuencia, se requiere un buen nivel de higiene y desinfección de la instalación y unos procesos de limpieza diarios efectivos (Takahashi y cols., 1996). Todos los requerimientos detrás de conseguir una instalación en perfectas condiciones, para producir alimentos de calidad, implican un gran consumo de agua y energía, pérdidas de producción y uso de productos

corrosivos para obtener una limpieza y desinfección efectivas (de Jong. 1997; D'souza y Mawson. 2005; Jun y Puri. 2005; Bansal y Chen. 2006; Doumèche y col. 2007).

Consecuentemente, entender cómo se genera el biofilm, fouling y biofouling y como eliminarlo correctamente, es esencial para una óptima limpieza y una mayor eficiencia en los tratamientos de limpieza, ahorrando dinero, agua y evitando residuos contaminantes por los productos empleados en los procesos de higienización (Takahashi y cols., 1996).

6. Fouling en el sector lácteo.

La problemática del fouling en la maquinaria de procesado de leche, se remonta a registros del siglo XIX. En una revisión, donde se comparaban distintos pasteurizadores y esterilizadores, sus usos en Europa como en América y otros aspectos como la formación del personal al cargo del procesado de la leche o la utilidad de estos procesos para hacer que las leches fueran más seguras y no provocaran ETAs, sobre todo en públicos infantiles (De Schweinitz. 1895). Este hecho indica, que poco después de la introducción de esta tecnología en E.E.U.U., ya se había detectado y estudiado esta problemática, las condiciones que favorecían su aparición y como intentar evitar su presencia.

La industria láctea, para producir leche de calidad, está sujeta a unos estrictos controles sanitarios. Son necesarios varios tratamientos para estandarizar los productos, alargar su vida y reducir el riesgo de estos para producir ETAs. El problema radica en que estos tratamientos se ven obstaculizados por la presencia de fouling, sobre todo en los procesos térmicos, donde este residuo se acumula en gran cantidad en las superficies (Fryer y Asteriadou. 2009).

El fouling derivado del tratamiento de leche tiene distintas propiedades y composiciones. Este hecho influye en las estrategias a desarrollar por parte de la industria (Barish y Goddard: 2013). Para la producción de leche de gran calidad, es necesario conocer las modificaciones que va a sufrir el producto o sus fracciones, durante su tratamiento, sobre todo si se aplican altas temperaturas (Ayala y cols. 2017).

Existe una gran cantidad de factores que influyen en la problemática del fouling lácteo. Entre ellos se encuentra el origen de la materia, que generará el fouling lácteo, la composición de la materia prima, la calidad microbiológica de la leche, contenido en aire del líquido, pH o el contenido en calcio. También hay otros factores externos a la leche, que pueden influir en la aparición de fouling lácteo, como el material de la instalación (cristal, acero inoxidable, plástico, goma, etc), recubrimientos antifouling, transmisión del calor de forma directa o indirecta, las técnicas aplicadas al alimento (como desnatado o concentración), la presión a la que se bombea el líquido, tiempo desde el ordeño hasta el procesado térmico, tiempo de contacto con la superficie ensuciada, etc. Todos estos factores han sido extensamente descritos en la bibliografía hasta el día de hoy y resumidos en varias revisiones bibliográficas como las de Bansal y Chen, (2006), de Barish y Goddard, (2013), en de Jong, (1997) o Foster y cols., (1988).



Figura 4: PHE de acero inoxidable 316 después de pasteurizar leche durante 8 horas (Barish y Goddard, 2013).

Generalmente, los problemas causados por la presencia de fouling en la industria láctea (Figura 4 y 5) se podrían resumir en: a) problemas de seguridad alimentaria y de calidad y b) problemas operacionales (Barish y Goddard, 2013, Hagsten y cols. 2016).

Los problemas relacionados con la seguridad y la calidad del producto final están relacionados con las propiedades del material que recubre las superficies. El fouling lácteo es un gran aislante térmico, por tanto, en procesos térmicos, donde suele acumularse en las superficies (especialmente en los PHE), el residuo impediría la transferencia de calor entre la superficie y el líquido, creando zonas de procesamiento con una temperatura de trabajo subóptima. Esta falta de temperatura puede producir una menor eliminación de microorganismos de la materia prima, provocando una mayor carga microbiana, que se traducirá en un producto que perecerá, antes de lo indicado en la fecha de consumo preferente. Otra posibilidad es una pobre eliminación de patógenos, que podrían provocar ETAs en los consumidores, debido a un tratamiento ineficiente de conservación.

Otro problema a destacar está relacionado con el procesado de diferentes productos en un mismo equipo. Esto puede suponer la acumulación de residuos muy resistentes en sus superficies, haciendo que haya algún producto que se pueda contaminar, tanto microbiológicamente, como por la presencia de elementos ajenos al producto producido *a posteriori* (por ejemplo, contaminación cruzada de alérgenos). Todo esto se resumiría en pérdidas económicas para la empresa, por la retirada de producto, antes de la venta, si es detectado en los controles de calidad, o posteriormente ya en el mercado, al ser rechazado por los consumidores. Además, no podemos dejar de considerar los costes asociados al tratamiento de la instalación para solucionar el problema (Bansal y Chen, 2006; Hagsten y cols. 2016).



Figura 5. PHE obturado por la acumulación de fouling caramelizado (Anónimo, 2007).

6.1. Clasificación y composición del fouling lácteo.

El fouling lácteo se puede clasificar de varios modos, pero el método más empleado es el que lo define según la temperatura a la que se genera. Se pueden diferenciar dos tipos distintos de fouling lácteo, **el tipo A**, que se genera en superficies con unas temperaturas de tratamiento comprendidas entre 75°C

y 110°C. La apariencia es voluminosa y esponjosa, con una coloración blanquecina. Su composición media mayoritaria es materia orgánica adherida, donde entre el 50% y el 70% son proteínas (en su mayoría β -Lactoglobulina (Bansaly Chen, 2006)), entre el 30 y el 50% son minerales y entre el 4 y el 8% lípidos (Burton, 1967).

En el fouling tipo A existe una composición y una distribución espacial muy heterogénea y variable. Ello hace que se modifique la porosidad y el grosor de la capa depositada, lo que a su vez, puede influir enormemente en la efectividad de los tratamientos de limpieza y su penetración en el residuo (Hagsten y cols., 2016).

El fouling **tipo B** se genera a partir de tratamientos térmicos por encima de 110°C. El fouling lácteo tipo B tiene un aspecto granulado y fuertemente adherido, su composición media se basa en materia inorgánica (70-80%), proveniente de las sales minerales de la leche, como puede ser el fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) o el citrato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$), proteína (15-20%) (mayoritariamente caseínas β 50% y α 27%) y lípidos (4-8%) (Burton, 1967; Visser y Jeurnink, 1997; Bansal y Chen, 2006; de Jong, 1997).

Bouman y cols., (1982) analizaron PHEs, después de su empleo para pasteurizar leche cruda, y encontraron que la ratio en peso de fosfato de calcio, contra proteína, era 30 veces mayor que los valores encontrados en la leche líquida. Otros investigadores han descrito un elemento importante, puesto que los pretratamientos modifican ampliamente la composición del fouling lácteo. Visser y Jeurnink, (1997) identificaron un cambio en la cantidad y composición total de los depósitos de residuos, después de un precalentamiento a 80-85°C durante 5-10 minutos. Por tanto, las leches pasteurizadas, empleadas para la

elaboración de productos lácteos, no van a generar la misma cantidad de residuo que la leche cruda al pasteurizarse.

Una de las principales controversias, aún no del todo aclaradas, es cómo se genera el fouling lácteo. En realidad, poco se conoce sobre qué elemento de la leche es el iniciador de todo el proceso de adhesión. Hay varias teorías sobre esta temática recopiladas en gran parte por Visser y Jeurink, (1997) y Bansal y Chen, (2006). Hay autores que defienden que, el elemento iniciador, son las proteínas del suero, otros defienden que es el calcio, el promotor de los depósitos de fouling.

Existe la hipótesis que afirma que las proteínas del suero son las iniciadoras del fouling lácteo, que desnaturalizadas a elevada temperatura, se separan del flujo de la leche y se depositan en las superficies, comenzando así el proceso de recubrimiento de la superficie con el fouling lácteo. Visser y Jeurink, (1997) con su trabajo afirma que son las proteínas las que inician todo el proceso, creando una capa inicial que más tarde hace de base para otros componentes de la leche.

Delplace y cols., (1997) propusieron, como primer paso, la generación de agregados proteicos. A la contra, de Jong y cols, (1992) identificaron, por el contrario, que la formación de esos agregados reducía la acumulación de fouling lácteo. Van Asselt y cols., 2005 descartaron la β -Lactoglobulina y sus agregados, en la formación del fouling. Bansal y Chen, (2006) crearon un modelo matemático con la implicación, tanto de agregados, como de proteínas desnaturalizadas.

Otros autores sugieren, que los minerales encontrados en la interfase superficie-fouling, se deben a un mecanismo de difusión, más que a ser la primera piedra de estas estructuras (Belmar-Beiny y cols., 1993).

Por tanto, no hay una idea clara del proceso de adhesión de los residuos. Quizás, para complicarlo todo un poco más, Visser y Jeurnink, (1997) observaron que, en experimentos con proteínas del suero y sales minerales de la leche, ya antes de calentar la solución, las proteínas se adherían a la superficie metálica.

En un intento posterior para aclarar este problema el trabajo de Jimenez y cols., (2013) resume el uso de un modelo de fouling para analizar la composición del fouling lácteo en las primeras fases de la deposición del fouling. Observó que existía una fina capa de proteínas entre la superficie de acero y las partículas de calcio. Otras publicaciones defienden que la capa proteínica es tan irregular que permitiría la entrada de sales minerales a 140°C, dando como resultado, que la primera capa se daría simultáneamente con proteínas y minerales (Foster y Green, 1990).

Por otra parte, los trabajos que defienden el rol del calcio como elemento cimentante de todo el residuo se basan en la presencia de sales minerales cerca de la superficie del tratamiento térmico, indicando que son la primera pieza del fouling lácteo (Foster y cols., 1989; Fryer, 1989).

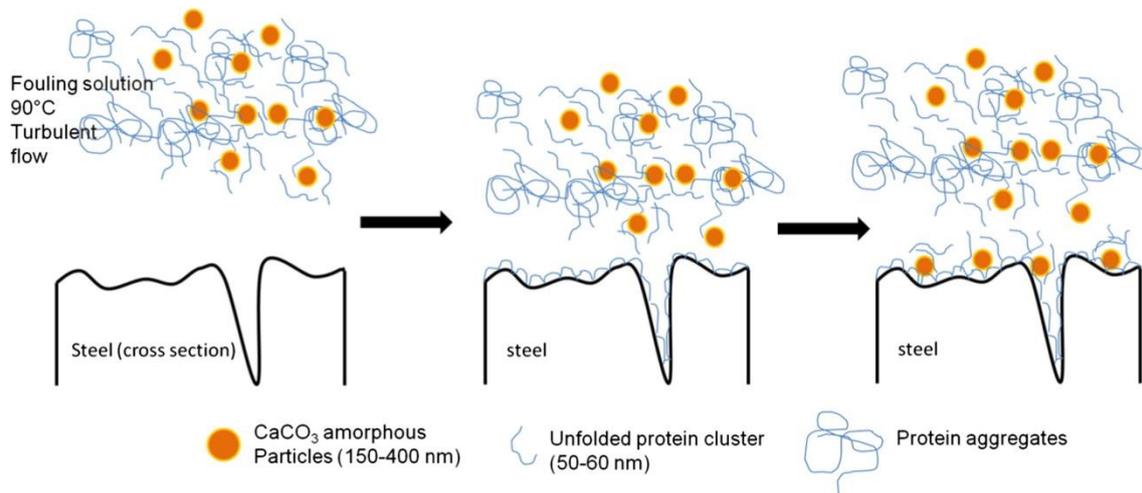


Figura 6: Esquema de la transferencia de proteínas del líquido a la superficie del proceso térmico (Jimenez y cols., 2013).

Toda esta información científica contrasta con las apreciaciones en el trabajo industrial. Así, el personal de la industria, cuando abre la maquinaria, especialmente los PHE, para realizar limpiezas del fouling o mantenimiento general de las instalaciones, se encuentran masas de fouling lácteo de color pardo sobre las superficies (Figura 4 y 5) (Barish y Goddard, 2013), lo que no parece concordar con los tipos de fouling A o B.

En otros estudios se ha visto que el fouling podía formarse con elementos no nitrogenados, especialmente sobre acero inoxidable, dada la elevada temperatura que adquiere la superficie metálica (Takahashi y cols., 1996). En este sentido, una nueva teoría derivada de esta tesis, relaciona la caramelización de la lactosa como la responsable del inicio de la adhesión del fouling de leche (Guerrero-Navarro y cols., 2016). Este azúcar es una fracción infravalorada, que muchas veces no aparece en los análisis de componentes del fouling lácteo. Conocer si realmente es quien inicia la adhesión es muy importante, dado que sería posible diseñar un producto que facilite su eliminación, lo que mejoraría sensiblemente los resultados del proceso de limpieza.

6.2. Seguimiento del fouling lácteo en las instalaciones lecheras.

Durante el procesado de la leche, sobre todo en instalaciones cerradas y de difícil acceso como los PHE, la acumulación de fouling lácteo se suele detectar de forma indirecta, fundamentalmente por cambio de presión en el interior del sistema (Van Asselt y cols., 2002; Fryer y Asteriadou, 2009). Hay sistemas comerciales para detectar ciertos parámetros, de forma puntual o de forma continua (On-line o In-line), que pueden ayudar a determinar el estado de la instalación y que también pueden ser de gran ayuda para la limpieza, como sensores de temperatura, pH, conductividad, etc. La acumulación de suciedad en el sistema podría ser detectada mediante detectores de biofilms, mediante cambios electroquímicos en el medio líquido, dado que la presencia de biofilms puede desembocar en la aparición de biofouling en la instalación (Anónimo. 2012).

7. Limpieza de instalaciones y eliminación de fouling lácteo de las superficies.

En la Unión Europea, la industria láctea y la cárnica son las dos contribuidoras más grandes al consumo de agua y energía del sector alimentario, produciendo un impacto ambiental de un 24% del total de la cadena de producción alimentaria (Weidema y cols., 2008; Ölmez y Kretzschmar, 2009). En la industria láctea se consume, de media, 6,5 MWh y 2 m³ de agua para la producción de una tonelada de leche procesada. El 80% del consumo energético se dedica a los procesos térmicos y a la limpieza e higienización de las instalaciones (Vasquez-Caicedo, 2015).

Los residuos generados, durante el procesado de leche, pueden comportar grandes problemas para la empresa productora. Reducen la eficiencia y

funcionamiento de los tratamientos térmicos y pueden permitir el establecimiento de microorganismos (Bansal y Chen, 2006; Nagata y cols., 1995).

Clasificar los tipos de fouling generado puede ser de gran ayuda, para entender el tipo de limpieza que necesita cada residuo, sobre todo si están formados por múltiples componentes, como proteínas, grasas, sales minerales y azúcares (Basso y cols., 2017).

El fouling también se pueden clasificar, para su limpieza (Figura 7), según si son solubles en agua (como residuos de azúcares o sales minerales monovalentes) o insolubles (que comportan más problemas para la limpieza). Esta última categoría se puede separar en orgánicos (grasas, aceites, azúcares y proteínas) o inorgánicos (depósitos de sales minerales insolubles como la cal del agua). La exposición a procesos térmicos puede alterar la estructura del fouling, por caramelización de los azúcares, desnaturalización de proteínas o carbonización de la materia orgánica, uno de los estados del fouling más difíciles de eliminar (Basso y cols., 2017). Profundizar en la naturaleza que mantiene unidos a los residuos con la superficie, ayudará a preparar los protocolos de limpieza. No es lo mismo eliminar los depósitos, con una naturaleza mayoritariamente cohesiva, pudiendo ser eliminados en su mayoría con un simple enjuague que hidrate la suciedad y la desprenda en grandes porciones, que eliminar depósitos con una naturaleza mayoritariamente adhesiva, que son mucho más complicados de eliminar (Liu y cols., 2006).

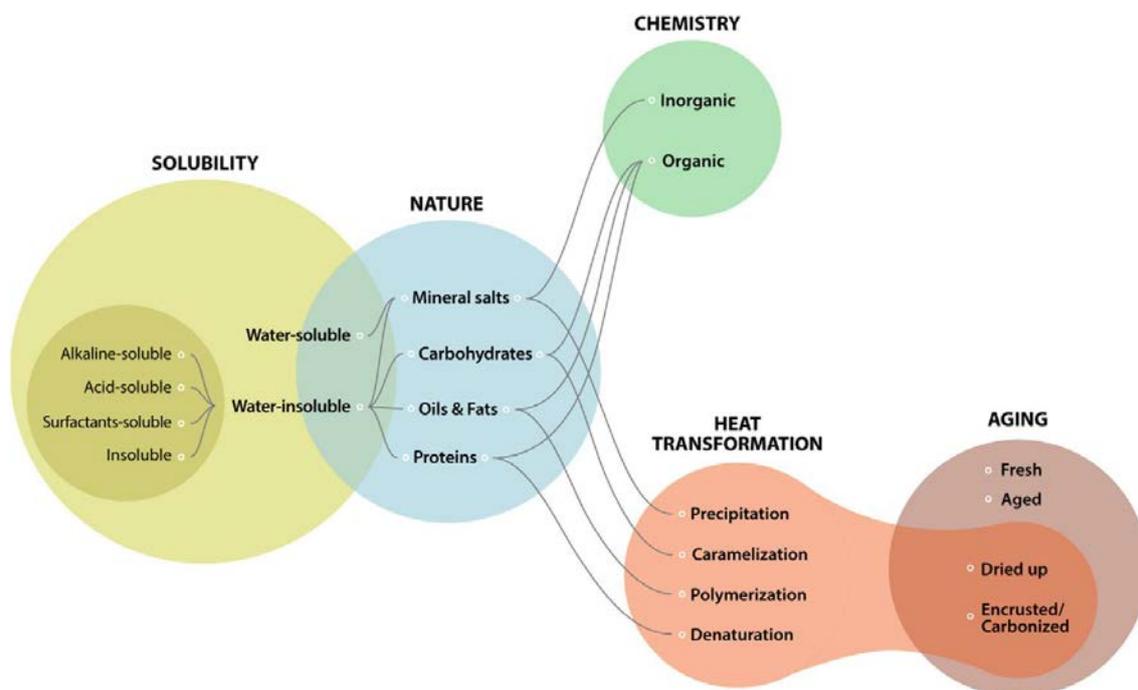


Figura 7. Clasificación del fouling basada en distintos parámetros como la naturaleza de sus componentes o su solubilidad (Basso y cols., 2017).

Entender cómo se genera el fouling es clave para poder optimizar la limpieza de la superficie. El proceso de limpieza en la industria alimentaria es ubicuo en todas las empresas. Se trata de un proceso caro y que requiere una gran inversión en personal y tiempo (Fryer y cols., 2011). Este esfuerzo se desglosa en tiempo de inactividad, personal dedicado y recursos económicos (energía, productos químicos, etc.). Por ello es esencial entender como eliminar la suciedad. Se ha llegado a contabilizar que, en los costes de producción en la industria láctea, hasta un 80% proviene del fouling lácteo y de los procesos de limpieza para eliminarlo (Van Asselt y cols., 2005).

Un buen control del proceso de limpieza es clave, dado que una reducción del tiempo empleado para estas operaciones de mantenimiento, repercutirá en una mayor capacidad de producción. Los procesos de limpieza se basan más en la experiencia del personal, planeados de forma empírica, como resultado de otros tratamientos para situaciones “parecidas”, que en estudios sobre este tipo de depósito, derivados de procesar leche en la planta y probar con soluciones

específicas. Por ello, se suele tender a extender los protocolos, para lograr una seguridad de proceso que no siempre es cierta (Nagata y cols., 1995; Changani y cols., 1997; Van Asselt y cols., 2002; Liu y cols., 2006). En la industria alimentaria, el 25% del tiempo de trabajo se suele dedicar a las tareas de limpieza de las instalaciones (Fryer y cols., 2011). La optimización de esos protocolos aporta ventajas, tanto a nivel económico, como a nivel medioambiental (Graßhoff, 2002; Nagata y cols., 1995; Takahasi y cols., 1996).

Los factores que influyen en la efectividad de la limpieza son, entre otros: El tiempo de contacto de los productos con los residuos, la concentración del limpiador, la temperatura de aplicación del tratamiento y la fuerza mecánica aplicada. Los elementos implicados en la limpieza se han resumido en forma de los círculos de Sinner (Figura 8): Estos factores pueden ser manipulados durante la limpieza, sobre todo en la que se usen productos químicos, pero se puede extender a la limpieza enzimática con ciertas excepciones (Basso y cols., 2017).

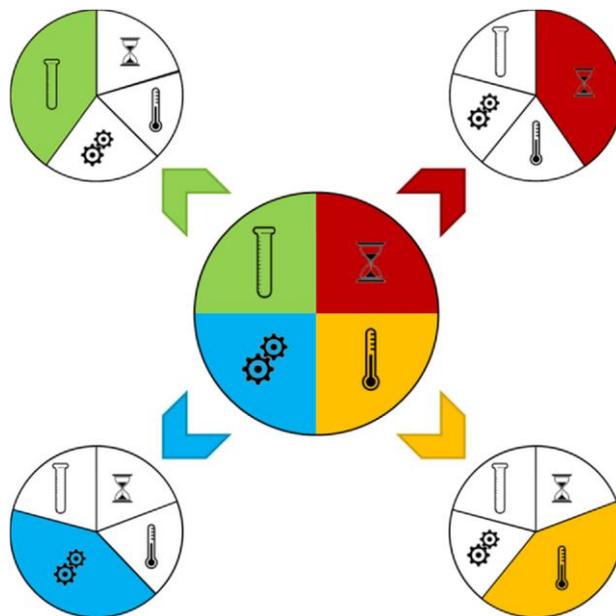


Figura 8. Esquemización de los círculos de Sinner. El incremento de uno de estos factores permite disminuir los otros tres factores, obteniendo los mismos resultados de limpieza (Basso y cols., 2017).

El sistema CIP es una de las piedras angulares para aplicar tratamientos de limpieza en la industria alimentaria. En la industria láctea se suele aplicar diariamente los tratamientos de limpieza mediante CIP. Esta técnica ayuda a conseguir una calidad constante en la producción, buena transferencia de calor en los PHE y evitar contaminación por microorganismos (Van Asselt y cols., 2002). Aparte de aplicar los tratamientos mediante este sistema, hay todo un conjunto de medidas enfocadas a la optimización, como pueden ser el seguimiento, mediante marcadores del proceso de limpieza, u otras estrategias para mitigar el efecto del fouling y mejorar su eliminación.

7.1. Limpieza empleando métodos químicos.

Para eliminar correctamente las obstrucciones de las cañerías, después de los tratamientos térmicos, se suele hacer un proceso doble separado, mediante soluciones ácidas y alcalinas a alta temperatura (Bylund. 1995; Graßhoff. 2002; Jeurnink y Brinkmann. 1994). No obstante, no hay un acuerdo científico sobre la mejor secuencia de los productos para eliminar los residuos.

Para eliminar los residuos grasos se suelen utilizar productos alcalinos (típicamente sosa caustica, NaOH) a alta temperatura, para saponificar los lípidos y disolverlos, gracias a la formación de jabones, en la corriente de agua del CIP. Sin embargo, el fouling lácteo contiene una fracción mineral, que aumenta, de forma directamente proporcional, a la temperatura de tratamiento aplicada. Para eliminar este residuo mineral, se suele emplear una solución de ácido (típicamente ácido nítrico, HNO₃), que desincrustará los depósitos de sales depositados en las superficies (Bylund, 1995; Graßhoff, 2002; Jeurnink y Brinkmann, 1994).

En el trabajo de van Asselt y cols., (2002) se recogen distintos tipos de procedimientos, para la limpieza de las instalaciones de procesado de leche. La temperatura óptima de lavado se encontraría entre los 65° y los 70°C. Por encima de 80°C no se suelen conseguir mejores resultados, en relación el incremento de energía para mantener tal temperatura (agua caliente y vapor). Además, a mayor temperatura se incrementa el riesgo de corrosión de los metales, que componen la instalación. Sin considerar que algunos componentes del fouling pueden coagular, adhiriéndose aún más.

Las soluciones alcalinas recomendadas, para eliminar la fracción orgánica del fouling lácteo de las superficies, es de un 0,5% en peso. A mayor concentración (>1%), los residuos pueden llegar a cambiar su estructura, apareciendo una consistencia gomosa, que dificulta su eliminación (Van Asselt y cols., 2002), a pesar de estas recomendaciones, las concentraciones más usadas en la industria suelen ser entre 0,5% a 1,5% de NaOH (Bylund, 1995).

Por debajo de la concentración recomendada, no se llega a eliminar correctamente los depósitos encontrados en las superficies. Además, el abuso en el empleo de productos corrosivos puede someter a un mayor estrés a las juntas de goma y otros elastómeros, que provocará que tengan una vida menor de lo esperado, incurriendo en un gasto adicional en mantenimiento. El producto alcalino más común, en la limpieza, es la sosa caustica, por encima de la potasa cáustica (KOH), aunque esta segunda se elimina más fácilmente en los enjuagues. La sosa cáustica es mucho más barata, y tiene un gran rendimiento para eliminar residuos proteicos (Tamime. 2008; Basso y cols., 2017).

A pesar de todo el proceso de limpieza, empleando diferentes productos corrosivos, a pH extremos y a alta temperatura, se pueden dar situaciones en las

que no se consiguen unos resultados adecuados (Timperley y cols., 1994). La limpieza correcta de las instalaciones es un proceso crucial, que genera efluentes que necesitan un especial tratamiento, sobre todo para neutralizar el pH antes de eliminar las aguas residuales. Este hecho es un problema cada vez más importante, especialmente para los sistemas de saneamiento de aguas residuales y las industrias que producen estos residuos (Changani y cols., 1997; Graßhoff, 2002). Hay que tener en cuenta, que a mayor nivel de contaminación de las aguas residuales, más elevados son los costes que han de pagar las empresas para la regeneración del agua. En el caso de Alemania, donde hay datos específicos para las industrias alimentarias, se suelen producir anualmente entre 2000 y 6000 toneladas de efluentes hipersalinos, no biodegradables (Graßhoff, 2002).

7.2. Limpieza empleando métodos biológicos

Otra aproximación a la limpieza correcta, en la industria alimentaria, pasa por el uso de limpiadores enzimáticos, mucho más respetuosos con el medio ambiente y con unas necesidades menores de consumo de agua y energía (Graßhoff, 2002; Lequette y cols., 2010; Takahasi y cols., 1996; Turner y cols., 2005).

Las enzimas son proteínas catalíticas, que reaccionan con un tipo (o grupo reducido) de compuestos químicos (sustrato diana). La actividad de los enzimas y su eficacia, van a depender de diferentes factores ambientales, como el pH y la temperatura. Para que la enzima tenga un máximo de actividad, hay que delimitar un rango específico de condiciones de trabajo (Madigan y cols., 2012; Nelson y Cox, 2014).

Las enzimas tienen un origen biológico, muchas de ellas microbiano. Dado que, en los organismos, las enzimas forman una parte esencial de su metabolismo y estos organismos se pueden encontrar en una gran variedad de ambientes distintos, se pueden obtener enzimas activas para una gran variedad de ambientes (Nelson y Cox. 2014).

El rendimiento de las enzimas en el medio físico se puede calcular con gran precisión. El problema viene cuando los cálculos se han realizado en entornos controlados de laboratorio, donde sólo se dispone de la enzima, su sustrato diana y condiciones estandarizadas de temperatura, pH y tiempo (Anónimo B, 2016; Boyce y cols., 2010; Côlho y cols., 2016). En entornos más reales, como a los que están sometidas las enzimas en una limpieza industrial, su comportamiento será mucho menos preciso y más alejado del esperado en función de la complejidad del sustrato, de modificaciones del pH y variaciones de la temperatura. Las matrices de alimentos y sus residuos son una mezcla compleja y heterogénea de compuestos químicos, que pueden ser modificados durante el transcurso de los procesados a los que se someten las materias primas (Argüello y cols., 2003; Whitehurst y Law. 2009).

Todo ello hace que el medio donde reaccionan sean muy distintos de los entornos de laboratorio.

A pesar de todo ello, se puede medir la actividad de las enzimas en entornos complejos como son los que residuos de la industria alimentaria, consiguiendo mantener ciertos factores ambientales controlados, tales como temperatura o pH en las zonas de máxima actividad, si se llegan a desarrollar modelos adecuados de generación de fouling (Argüello y cols., 2003; Boyce y cols., 2010; Whitehurst y Law, 2009).

Gracias a estas simulaciones, a escala de laboratorio, se pueden desarrollar herramientas muy útiles. De esta forma, las proteínas catalíticas se pueden utilizar para procesos de limpieza, dado que se pueden elegir las enzimas que mejor se adapten al entorno de limpieza deseado, si la superficie a limpiar no tolera temperaturas extremas. Además, se pueden elegir aquellas que mejor funcionen a temperaturas bajas o altas, o simplemente elegir aquellas que necesiten menor control de los factores ambientales, para asegurar una limpieza sin excesiva inversión en energía y medios de control (Argüello y cols., 2003).

Con esta estrategia se puede eliminar la cantidad de contaminantes corrosivos en las aguas residuales, limitando su empleo en instalaciones, lo que aumentará la vida útil de las instalaciones y eliminará peligros para el personal (Boyce y cols., 2010; Graßhoff, 2002).

Este es el caso del uso de detergentes, con base enzimática, en instalaciones que usen sistemas de filtración por membrana. Esto ha conseguido un gran ahorro en sus costes de mantenimiento, dado que el cambio de las membranas dañadas o envejecidas puede suponer un coste de entre un 25% y un 40% de los costes operacionales de la instalación. La alternativa a las enzimas sería el uso de productos corrosivos, tanto para los residuos a eliminar como para la propia membrana, obteniendo un tiempo menor de uso de los sistemas de filtración en condiciones óptimas (D'souza y Mawson, 2005).

7.3. Seguimiento del proceso de limpieza.

Los procesos de limpieza suelen estar estandarizados para cada día de trabajo, no personalizados a cada situación, por lo que hay pocas formas de comprobar la eficacia de la limpieza en el mismo momento de realizarla. Entre los sistemas comerciales que existen, hay algunos que mediante sensores a lo largo de la instalación y con mediciones a lo largo del proceso, obtienen datos en continuo de distintos marcadores, como puede ser el pH, conductividad, turbidez o la fluorescencia de ciertas partículas, para determinar en qué momento se deja de liberar residuos al agua de limpieza y enjuague (Van Asselt y cols., 2002, Guerrero-Navarro y cols., 2015).

Con las mediciones en continuo se intenta conseguir el máximo de eficiencia de limpieza, al detectar los cambios en el momento que suceden. Puede detectar la eliminación del fouling lácteo por cambios en la conductividad de la solución acuosa, dado que, a mayor carga de sólidos totales disueltos, mayor conectividad presentará el sistema (Van Asselt y cols, 2012).

Otras formas de medir la eliminación del fouling lácteo pueden ser la medición de la fracción orgánica, arrastrada por las aguas de enjuague, por medición de turbidez o de fluorescencia. Las mediciones de la fracción inorgánica eliminada se pueden detectar mediante sensores para calcio iónico en la solución analizada (CHEMFET) (Van Asselt y cols., 2002).

Otras metodologías como la medición de proteínas o del nivel de nitrógeno de las superficies, se pueden usar una vez terminado el proceso de limpieza. Esto se emplea para verificar el nivel de higiene conseguido.

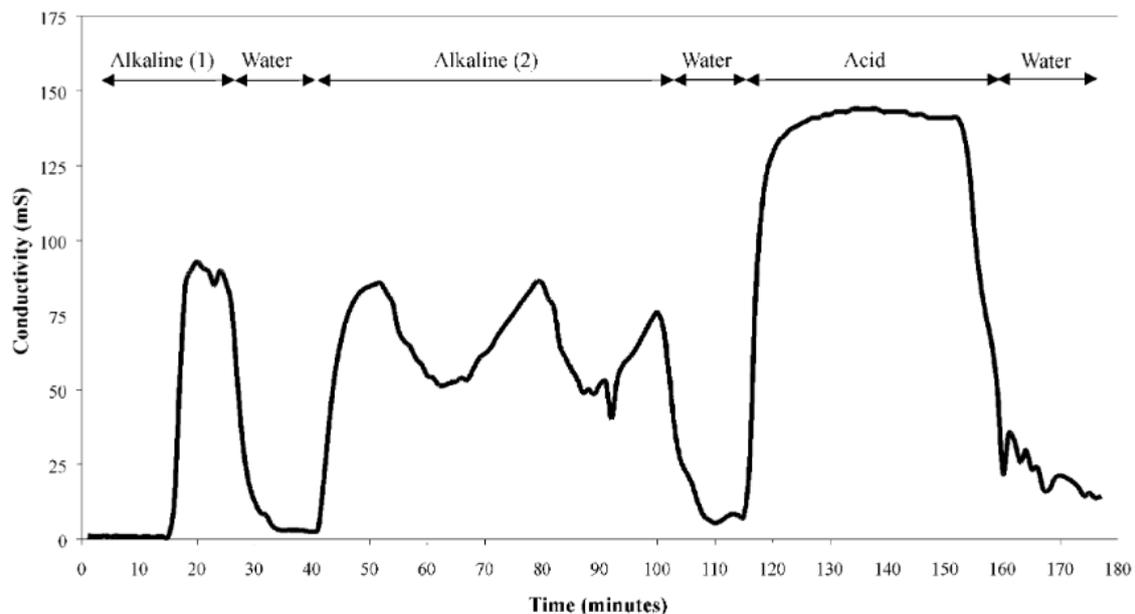


Figura 9. Ejemplo de monitorización de la limpieza de un evaporador mediante análisis de la conductividad de la solución de limpieza (Van Asselt y cols., 2002).

8. Modelos de fouling lácteo a escala de laboratorio.

Para la industria es prácticamente imposible saber la extensión y composición del fouling de toda la instalación, por lo que el uso de modelos de laboratorio, representativos del fouling real, aporta una gran herramienta para la evaluación de la eficacia de los procesos de limpieza. Estos aportan un punto de vista más estocástico (teniendo en cuenta tanto lo que ya sabemos cómo el efecto del azar) que una aproximación puramente determinista (regido por las leyes de la naturaleza y sin intervención del azar) (Fryer y Asteriadou, 2009).

Elegir la estrategia de limpieza idónea en la industria alimentaria requiere entender la composición del fouling, sus características y sus interrelaciones entre el residuo, la superficie y el alimento procesado (D'souza y Mawson, 2005).

Para mejorar los procedimientos de limpieza actuales, hay que considerar el tipo de materiales que componen la maquinaria, para diferenciar el tipo de fouling que puede acumularse en cada zona y el tipo de tratamiento que puede tolerar cada elemento. Se han ideado una gran variedad de modelos, desde distintos enfoques, para estudiar la aparición de fouling lácteo en la industria y poder probar nuevos sistemas para eliminarlos. La revisión de Jun y Puri (2005) aportó un resumen de más de cuarenta tipos distintos de estudios y modelos sobre esta temática.

Hay modelos donde se han conseguido acumulaciones de fouling de hasta 0,54 mg/cm² (Foster y cols, 1989). En otros estudios se ha logrado alcanzar 12,73 mg/cm² (Barish y Goddard. 2013). A mayor cantidad de fouling conseguido, más representativo será el modelo para la evaluación de detergentes, dado que, si logra eliminar una cantidad superior a la generada en situaciones reales, se obtendrán buenos resultados en condiciones de aplicación industrial.

Nagata y cols., (1995) crearon un modelo de fouling lácteo basado en partículas de acero inoxidable de tamaño conocido y usando β -Lactoglobulina. El modelo se generó manteniendo en contacto las partículas con la solución de β -Lactoglobulina, en agitación a 75°C durante 1h. El objetivo fue evaluar diferentes tratamientos de limpieza (NaOH y fórmula enzimática a base de proteasa), empaquetando las partículas, con el fouling lácteo, en una columna, por la que se inyectaba el producto limpiador, analizando el efluente resultante de la limpieza, para cuantificar la cantidad de proteína eliminada del fouling.

Britten y cols., (1988) estudiaron la formación del fouling lácteo sobre discos de acero inoxidable 316, los cuales estaban montados sobre un soporte que imitaba a un PHE, transmitiendo el calor de un sistema cerrado a la leche de un

recipiente aparte (100°C durante 1 h), donde se mantenía en constante agitación. Todo ello para poder entender el rol que tenía la energía de superficie, a través de recubrimientos que modificarán la rugosidad y la energía de superficie de las bases de los modelos de fouling y la modificación de las propiedades de transmisión de la temperatura de los modelos.

Foster y cols., (1988) y Foster y Green (1990) crearon una serie de modelos de fouling lácteo sobre discos de acero inoxidable 316, tanto fouling tipo A como tipo B, usaron el sistema descrito por Britten y cols., (1988) para generar los modelos. Con ellos se estudió la formación y composición del fouling lácteo y así poder evaluar los factores que alteraban la dinámica (precalentamiento) o la estimulaban (pH, tiempo, temperatura).

Dentro de los sistemas para producir un modelo de fouling lácteo en láminas de acero inoxidable, existe el sistema de Boyce y cols., (2010), parecido al descrito en este trabajo y en Guerrero-Navarro y cols., (2015). En él se describen unas superficies de acero inoxidable rectangulares, las cuales se someten a un tratamiento térmico antes en un recipiente metálico, al que más tarde se añade leche cruda de vaca precalentada a 50°C. Las láminas de acero se mantienen con la leche por un periodo de 90 min entre 84 y 89°C. Una vez terminado el tiempo de contacto, los modelos recibieron un enjuague con agua a 50°C. Todo este proceso sirve para poder estudiar la composición del fouling sobre el modelo mediante SEM y CLSM y evaluar la efectividad de distintos productos químicos y enzimáticos comerciales y de formulación propia, mediante el análisis de la demanda química de oxígeno y la cantidad de proteínas en las soluciones de limpieza junto a microscopía. El objetivo del estudio era el de buscar un producto enzimático eficaz para sustituir a los procesos alcalinos usados en CIP, llegando a la conclusión de que 3 de los productos comerciales enzimáticos probados cumplían todos los requisitos que buscaban.

Otro tipo de modelos de fouling son los realizados durante la pasteurización en instalaciones industriales, en vez de en el laboratorio. Estos requieren más material y equipo, pero pueden llegar a ser más fieles a la realidad. Este es el caso del trabajo publicado por Hagsten y cols., (2016), acopando una estructura de soporte, para las superficies que albergarían el fouling, y esta acoplada al flujo de leche de una planta piloto, realizando un proceso de UHT durante 15 h. De esta forma obtuvieron modelos de fouling para estudiar su composición y estructura, tanto mineral como proteica. Evaluaron las diferentes capas, desde la superficie hasta la capa más basal del residuo.

Otra versión parecida a esta, es la de Jimenez y cols., (2013), donde introdujeron láminas de acero inoxidable 316L de 1 cm² en el interior de un PHE. Y trataron una solución de proteínas de suero lácteo con y sin sales de calcio, a 92°C de temperatura de salida del PHE. Obteniendo un modelo de fouling lácteo donde se investigó cual era el elemento que iniciaba la adhesión, si las proteínas o el calcio.

Muchos de estos modelos se pueden exportar para otros tipos de fouling alimentario como los descritos a continuación.

Uno de los materiales más empleados, para la creación de modelos de fouling lácteo, es el acero inoxidable, uno de los materiales más utilizados en la industria para contacto (Anónimo. 2004). Su amplia distribución ha hecho, que numerosos equipos de investigación, basen sus modelos en este material. En un estudio publicado por Liu y cols., (2006) describen distintos modelos de fouling alimentario (leche, salsa de tomate, masa de pan y albumina de huevo), para representar los residuos adheridos a la superficie después de su tratamiento térmico sobre discos de acero inoxidable. En este estudio se analizó los modelos

mediante micromanipulación, para identificar sus propiedades cohesivas y adhesivas. Y gracias a esa información, plantear la mejor forma de limpiar estos residuos y comprobar la efectividad de recubrimientos antifouling.

No sólo se han planteado evaluaciones de la formación de fouling en alimentos, ya que es un problema, igualmente importante, en la industria de bebidas. Por ello, Takahashi y cols., (1996 A y B) desarrollaron modelos para distintos refrescos y bebidas (3 tipos de cafés, 1 tipo de té oolong y 1 tipo de zumo de manzana) y sustancias control (β -Lactoglobulina bovina, tanto en estado nativo como desnaturalizada, ambas versiones con y sin ácido tánico). El modelo fue creando usando partículas de acero inoxidable de área conocida, una cantidad conocida de partículas de acero se mantuvieron (a distintos tiempos) en un matraz, donde se inyectaba el líquido muestra y manteniéndolo en agitación con las partículas (entre 50°C a 95°C), a partir de cierto volumen de líquido, el sobrante era eliminado por una canalización secundaria. Una vez recuperadas las partículas de acero al terminar el tiempo de contacto con la sustancia elegida, se identificó los componentes del fouling mediante la cantidad de nitrógeno y de carbono orgánico total. Se identificaron los tiempos y temperaturas con mayor acumulación de residuos. Y a posterior se usó el modelo para probar distintos sistemas de limpieza (detergentes químicos alcalinos, soluciones de NaOH, un limpiador químico ácido y una fórmula propia a base de proteasa), dando distintos resultados según el origen del fouling, generalmente obteniendo un mejor rendimiento las enzimas que el NaOH en todos los casos, teniendo en cuenta que la fuente de las enzimas es un preparado no purificado.

En el caso de que se usen membranas de filtración que sufran problemas de fouling, se ha planteado que la estructura tridimensional que tienen los biofilms,

guarda gran semejanza con el fouling y pueden servir como modelo de ensuciamiento para este material (Doumèche y cols., 2007).

9. Técnicas de análisis del fouling lácteo.

Identificar los elementos que componen en fouling y como se estructuran espacialmente es de gran importancia, para estudiar estos residuos y así prevenir su aparición, en la medida de lo posible, o poder lograr su completa eliminación, mediante protocolos de limpieza optimizados a cada residuo.

Hay una gran variedad de técnicas analíticas disponibles para estudiar el fouling lácteo. La elección de cada técnica comportara una batería de ventajas y desventajas para cada información obtenida. La mejor estrategia se basaría en un enfoque multidisciplinar, obteniendo las ventajas del máximo número de técnicas, para imitar las desventajas.

A la hora de elegir las metodologías para el estudio de los componentes y su distribución, hay que definir: a) qué elemento se analizará con cada sistema, b) si la técnica será cuantitativa o cualitativa, c) si las muestras pueden ser procesadas para el sistema de elección, d) el tiempo para obtener los resultados de cada análisis, e) los costes de desarrollo de cada proceso mediante esta técnica, f) la disponibilidad de uso de la maquinaria, g) los requerimientos de material o personal especializado para realizarlo y h) los elementos necesarios para el desarrollo de todo el protocolo de forma segura.

En este caso, trabajaríamos con fouling lácteo adherido a superficies de acero inoxidable. Su composición y estructura dependen del tipo de materia prima, de

los materiales de la instalación y del tratamiento térmico al que se somete la superficie y la leche, obteniendo fouling tipo A y tipo B (Hagsten y cols., 2016).

Para este tipo de residuos se pueden analizar las fracciones orgánicas e inorgánicas por separado o en conjunto:

- **Microscopía óptica:** Es una de las técnicas analíticas más extendidas y comunes en la mayoría de laboratorios. Sus ventajas se basan en su facilidad de uso y que se puede obtener información sobre la superficie y morfología de las muestras observadas. Sus principales inconvenientes se basan en los problemas de definición de la imagen, en los mayores aumentos y la dificultad de discernir entre distintos componentes (Jimenez y cols., 2013).
- **Microscopía de epifluorescencia directa (DEM):** Esta técnica analítica permite utilizar colorantes fluorescentes selectivos, para poder identificar, de forma rápida, la composición y la estructura de la superficie de las muestras. Es una técnica muy rápida y fácil de utilizar. El inconveniente se plantea en muestras muy rugosas o con una fuerte autofluorescencia, ya que pueden impedir la obtención de datos de forma satisfactoria.
- **Microscopía confocal láser de barrido (CLSM):** Es una tecnología ampliamente utilizada para analizar la estructura de alimentos y su composición, gracias a la gran variedad de colorantes selectivos fluorescentes y a las posibilidades que aporta el post-procesado, mediante software especializado en tratamiento de imágenes (Auty y cols., 2001). Mediante esta técnica, se ha estudiado la estructura y la distribución de grasas y proteínas en diferentes alimentos grasos, como el queso mozzarella y algunos tipos de chocolate (Auty y cols., 2001), glóbulos grasos en leche y

derivados lácteos (Evers y cols., 2008), lípidos en leche humana y fórmulas infantiles (Gallier y cols., 2015) o glóbulos de grasa en leche de búfala (Nguyen y cols., 2015). En otros estudios se pudo identificar la estructura tridimensional del fouling en membranas de filtración (Doumèche y cols., 2007) o en los fangos activados, depositados en una planta de depuración de aguas residuales (Ding y cols., 2015). En el fouling lácteo también se utilizó esta técnica, para estudiar la estructura y la composición, a diferentes temperaturas, de los modelos de fouling (Guerrero-Navarro y cols., 2016; Hagsten y cols., 2016).

- **Microscopía electrónica de barrido (SEM):** Se trata de un sistema para visualizar la superficie de muestras de diversos orígenes. Se ha empleado extensivamente para estudiar todo tipo de biofilms, foulings y biofoulings. (Barish y Goddard, 2013; Britten y cols., 1988; Bouman y cols., 1982; Foster y cols., 1988; Foster y Green, 1990; Flemming, 2002; Hagster y cols., 2016; Jimenez y cols., 2013; Kolter y Greenberg, 2006; Visser y Jeurnink, 1997).
- **Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDX):** Se trata de un sistema de detección de elementos, acoplado a un SEM, para poder identificar y, si la muestra lo permite (elementos más pesados que el carbono), cuantificar los elementos atómicos de la muestra. Se ha aplicado para poder estudiar la acumulación de minerales durante la formación de fouling lácteo (Bouman y cols., 1982; Foster y cols., 1988; Hagsten y cols., 2016).
- **Espectrometría óptica de plasma acoplada (ICP-OES):** Se trata de una metodología empleada en química analítica para cuantificar, cantidades ínfimas de minerales metálicos, en las muestras procesadas, siempre que el tipo de muestra lo permita, dado que ha de ser digerido en condiciones

ácidas en tubos de teflón, calentando con microondas de laboratorio o en vasos de precipitado, sobre placas calefactoras (Hagsten y cols., 2016).

- **Espectrometría del infrarrojo cercano (NIRS):** Es un método muy útil, ya que se trata de una técnica rápida y no destructiva, aplicable a una amplia gama de muestras, siempre que se disponga del patrón pertinente para ese tipo de matriz. En leche es posible determinar directamente grasa, proteína y sólidos totales, por ejemplo. Del espectrograma obtenido, de la muestra de leche, es necesario referenciarlo con un patrón del tipo de muestras analizada. El patrón consistiría en repeticiones de espectrometrías mediante NIRS, que a la vez se han analizado con otras técnicas analíticas, como sería el método Dumas o Kjeldahl, para determinar la cantidad de proteínas, o el método Gerber, para determinar grasas en leche. Este método ha sido ampliamente empleado para identificar leche en polvo adulterada (Capuano y cols., 2015).
- **Método Lowry:** Se trata de una técnica muy conocida para cuantificar proteínas mediante el reactivo de Folin-Wu (Lowry y cols., 1951). Al ser un método sensible y fácil de realizar, se emplea para determinar la cantidad de proteínas presentes en las aguas de enjuague, sobre todo después de diferentes tratamientos de limpieza industrial. Esto permite conocer si hay fouling y cuándo la limpieza ha concluido (Nagata y cols., 1995).
- **Método Bradford:** Es un método colorimétrico para analizar proteínas, sobre todo en muestras clínicas (Bradford, 1976; Liu y cols., 2015). Por tanto, podría funcionar como el Lowry.
- **Método Dumas:** Se emplea para determinar proteínas, mediante el análisis de los residuos de la combustión de la muestra. Se aplicó para determinar los residuos de proteínas de modelos de fouling en instalaciones de

tratamiento de refrescos. (Takahashi y cols., 1996 A y B) o para cuantificar el contenido proteico en distintas leches de mamíferos marinos (Oftedal y cols., 2014)

- **Método del ácido sulfúrico-fenol** o sus modificaciones: Es una técnica empleada para la cuantificación de carbohidratos. Requiere patrones antes de poder analizar ninguna muestra. No obstante, es una técnica de gran flexibilidad, dado que se puede utilizar en multitud de matrices (Albalasmeh y cols., 2013; Dubois y cols., 1956; Masuko y cols., 2005; Safarik y Santruckova, 1992).
- **Espectrometría de masa iónica secundaria (SIMS)**: metodología para identificar la composición de superficies o capas finas depositadas sobre superficies a partir de pulverizar la muestra mediante un haz de iones, a partir de los iones eyectados, se realiza una espectrometría de masas para identificar los compuestos. Se ha empleado para identificar muestras de fouling lácteo, siguiendo el protocolo descrito por Britten y cols., (1988). (Foster y Green, 1990)
- **Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM)**: Se trata de un método basado en una sonda, que se desplaza por la superficie de la muestra para obtener información a nivel nanométrico. Se ha utilizado para analizar la superficie de las muestras e identificar la estructura y el nivel de rugosidad de distintos modelos de fouling (Barish y Goddard, 2013; Jimenez y cols., 2013).

- **Difracción de rayos X de amplio ángulo (WAXD):** Se trata de una técnica empleada para identificar el estado cristalino y la estructura cristalina de la muestra. Se ha aplicado para identificar el estado cristalino de las sales minerales, sobre una muestra de fouling lácteo, generada durante un proceso de UHT (Hagsten, y cols., 2016)

**IV: Estudio de la formación de un modelo de fouling
lácteo y su idoneidad para evaluar productos de
limpieza industrial**

1. Material y métodos.

Se realizaron dos modelos de fouling en el laboratorio a partir de leche cruda de vaca, para simular la suciedad acumulada en los tratamientos térmicos industriales. Mediante estos modelos se podrán realizar ensayos de limpieza, usando, tanto productos comerciales como enzimáticos de forma rápida y con un sistema de seguimiento del proceso, de forma indirecta y sencilla.

1.1. Fuente del fouling lácteo.

Los modelos de fouling lácteo (MFM) se generaron a partir de leche entera cruda de vaca, proporcionada, por una granja lechera (Granja Can Bordoí, Sant Antoni de Vilamajor, España) y guardada en refrigeración hasta el momento de uso (5°C).

1.2. Modelo de fouling lácteo en condiciones de ciclos de secado.

1.2.1. Superficies para el fouling lácteo.

Para la producción de fouling tipo A se usó acero inoxidable tipo AISI 316, que es uno de los materiales más usados, para contacto alimentario, en la industria lechera y, sobre todo, en los intercambiadores de calor de placas (PHE). Este material es especialmente interesante para los equipos empleados en tratamientos térmicos, como la pasteurización.

Otra particularidad, respecto al material base para todos los experimentos, es el grado de pulido de las superficies. Usando los datos bibliográficos sobre el pulido de las superficies a nivel industrial, usados a día de hoy por las empresas alimentarias, se decidió usar el pulido 2B para el acero inoxidable (Barish y Goddard, 2013; Foster y cols., 1989; Jimenez y cols., 2013).

Para la producción de fouling lácteo (MFM) en el laboratorio, se puede adaptar la forma y tamaño del modelo a las necesidades específicas de cada laboratorio, sobre todo teniendo en mente los posteriores análisis que se quieran hacer con ellos.

En este experimento se eligieron laminas cuadradas de acero inoxidable de 5 cm de lado, con un grosor de 0.1 cm. Antes de su empleo en el laboratorio, las superficies usadas de base para la producción de fouling lácteo, se limpiaron y desinfectaron de acuerdo con la sección 5.2.3 de la norma UNE-EN 13697:2015.

El procedimiento consistió en sumergir las superficies en un baño de agua jabonosa durante 1 hora. Luego se enjuagaron vigorosamente, usando agua desionizada, para eliminar todos los restos de jabón, suciedad y sales, que pudieran quedar depositadas en la superficie. Posteriormente, y siempre manipulando las láminas de acero inoxidable con guantes, se sumergieron en una solución de alcohol isopropílico (2-propanol) (Panreac, Castellar del Vallès, España) al 70%, usando agua desionizada, durante 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de contacto, se eliminó el alcohol y las superficies se secaron en una estufa de aire forzado IDL-FI-80 (Labolan, S.L. Esparzar de Galar, España) a 50°C, para eliminar cualquier rastro de humedad en las piezas metálicas. Por último, se guardaron, de forma individual, en bolsas de papel termoselladas, para evitar que acumulasen polvo u otra suciedad antes de su utilización.

Para poder usar volúmenes mayores de leche sobre las superficies, se colocaron paredes extraíbles, durante la producción del fouling, dando forma de contenedor. Una vez obtenido el fouling, se eliminaron las paredes para que no pudieran interferir durante los análisis posteriores o durante las etapas de limpieza.

Las paredes extraíbles se hicieron con cinta adhesiva de aluminio termo-resistente (Ceys, L'Hospitalet del Llobregat, España), con una altura de 1 cm desde la base de las superficies (Figura 10).

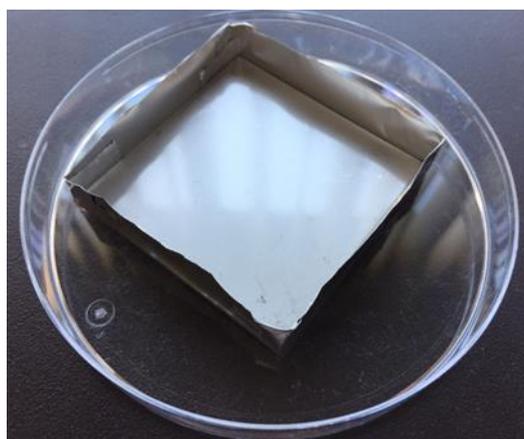


Figura 10: Superficie de acero inoxidable 316 2B (5 x 5 cm) con paredes de aluminio (1 cm de altura) para ser usados en la producción del modelo fouling lácteo en laboratorio (MFM).

1.2.2. Productos de limpieza.

Se emplearon ocho productos de limpieza distintos para evaluar el modelo de fouling lácteo (MFM) (Tabla 2). En todos los casos los productos de limpieza fueron diluidos en agua desionizada.

Dos de los productos elegidos fueron productos ya comercializados, para la limpieza de instalaciones en la industria alimentaria. Uno de ellos, el CS1, fue de base alcalina, un limpiador de un solo pase (sin posteriores tratamientos ácidos), usado para la eliminación de fouling en la industria y que será usado como tratamiento químico control. El segundo producto comercial (CS2), es un limpiador con base enzimática, junto a un tensoactivo.

Los otros seis productos de limpieza (CS3, CS4, CS5, CS6, CS7 y CS8) fueron formulaciones propias, usando distintas combinaciones de proteasa Savinnase 16L® (Novozymes, Bagsværd, Dinamarca), amilasa Termamyl Ultra 300L® (Novozymes, Bagsværd, Dinamarca), a los cuales se les añadió un tensoactivo, para mejorar las fórmulas, estas formulaciones se aplicaron a distintos pH.

Tabla 2: Listado de productos de limpieza empleados en este estudio contra el fouling lácteo y sus condiciones de uso:

Soluciones de limpieza (CS)	Componentes y concentraciones finales	Temperatura de trabajo	pH de trabajo	Tiempo de limpieza (min)
CS1	6% Producto químico alcalino	70°C	10-12	45
CS2	0,05% producto enzimático comercial y 0,25% tensoactivo	50°C	9.5	30
CS3	0,0012% proteasa, 0,0010% amilasa y 0,25% tensoactivo	50°C	9.5	30
CS4	0,0012% proteasa y 0.25% tensoactivo	50°C	9.5	30
CS5	0,25% tensoactivo	50°C	9.5	30
CS6	0,0012% proteasa, 0,0010% amilasa y 0,25% tensoactivo	50°C	9.2	30
CS7	0,0012% proteasa y 0,25% tensoactivo	50°C	9.2	30
CS8	0,0012% proteasa, 0,0010% amilasa y 0,25% tensoactivo	50°C	8.5	30

Aunque el producto CS5 solo está compuesto por un tensoactivo, se usó siguiendo los mismos parámetros que los demás productos con enzimas. Todas las soluciones enzimáticas fueron producidas diez veces más concentradas, respecto a las indicaciones de uso final. Para agilizar los procesos de limpieza, dado el tiempo que requería el ajuste de pH en las soluciones enzimáticas, las

soluciones se guardaron en alícuotas de 7,5 ml en tubos de estériles, a -18°C, para su posterior uso.

1.2.3. Producción del modelo de fouling lácteo (MFM) en condiciones de ciclos de secado.

Para la producción de fouling, el primer paso fue pesar las superficies metálicas con la cinta de aluminio a su alrededor (contenedores) con una balanza analítica Mettler AE 100 (Mettler-Toledo S.A.E, Hospitalet del Llobregat, España).

Una vez pesados y numerados los contenedores, se precalentaron en una estufa de aire forzado IDL-FI-80 (Labolan S.L. Esparzar de Galar, España) a 90°C, para poder hacer el fouling tipo A.

La leche cruda de vaca se atemperó en un intervalo de 18°C – 21°C, antes de realizar el ensayo de formación de fouling. Una vez precalentados los contenedores, se añadieron 3 ml de leche a cada uno de ellos. Cada uno de los contenedores, con la leche cruda, se reintrodujeron a una estufa y se mantuvieron durante 45 min a 90°C, para que se eliminara la máxima cantidad de agua contenida en la leche. El ciclo de añadir leche y de secado en estufa se realizó 5 veces, incrementando el fouling formado en cada ciclo. Una vez terminado el quinto ciclo, se realizó una etapa de enjuague con agua, para simular el flujo de líquido y la presión de la circulación de la leche. Para ello, cada uno de los contenedores con el fouling formado, se trasladaron a frascos (58 x 69 mm), con el suficiente espacio para agitarlos, y se añadieron 30 ml de agua desionizada a 50°C. Cada frasco fue agitado vigorosamente usando un agitador REAX Top (Heidolph Instruments, Schwabach, Alemania), al máximo de intensidad, durante 1 min. La etapa de agitación con agua caliente consigue desprender toda la materia soluble de la leche, que previamente se acumularon en el modelo de fouling en cada contenedor. El enjuague también sirvió para

retirar parte de los residuos, compuestos por materia insoluble y precipitados adheridos débilmente a las superficies de los contenedores.

Con este procedimiento se busca, que la leche se adhiera al acero a alta temperatura y, con los enjuagues, que se elimine todo lo que no se adhirió fuertemente a las superficies, permaneciendo solo la materia que simulará el fouling.

Después de la etapa de enjuague, los contenedores se lavaron ligeramente, usando un frasco lavador con agua desionizada. Una vez retirado todo elemento no adherido con el lavado, se volvió a precalentar cada contenedor a 90°C, en una estufa de aire forzado. Una vez conseguida la temperatura de trabajo, se repitió el procedimiento de añadido y secado de la leche cinco veces más (diez ciclos en total al finalizar el modelo), acabando con el enjuague con agua a 50°C y agitación, como se realizó anteriormente.

Una vez finalizado el procedimiento de los diez ciclos, para formar fouling en los contenedores, estos se dejaron secar usando el calor residual de la estufa apagada, que se usó para la formación de fouling. Una vez totalmente secos, a temperatura ambiente, se determinó por segunda vez el peso de los contenedores con el fouling formado usando una balanza analítica.

Realizada la segunda pesada, se eliminaron las paredes de aluminio de los contenedores para obtener el modelo de fouling sobre las superficies de acero inoxidable y se volvieron a pesar.

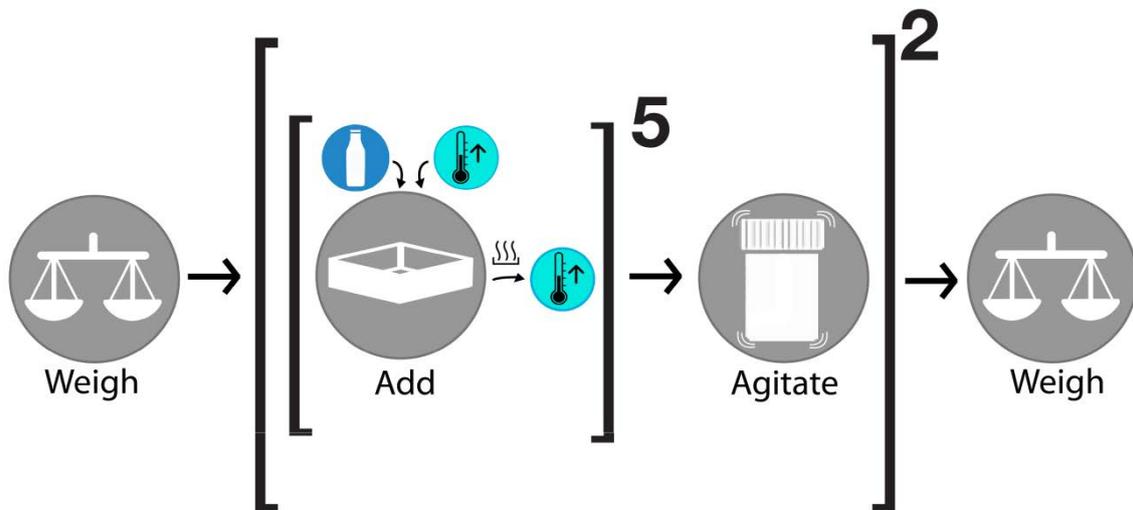


Figura 11: Esquema simplificado de los pasos para producir modelos de fouling lácteo en el laboratorio (MFM).

Todo el proceso se resume en la figura anterior (Figura 11), siendo la base de todo el proceso, repeticiones de tres acciones distintas, pesar, añadir y secar leche y enjuagues en agua caliente y agitación.

1.3. Producción de un modelo de fouling lácteo en condiciones de recirculación.

Con los resultados obtenidos por nuestro método de producción de fouling en el laboratorio, se quiso comparar con los resultados de otro modelo de fácil producción, ya descrito en la bibliografía científica, usado también para probar productos de limpieza industriales.

Se seleccionó un sistema basado en la recirculación de leche usando un matraz kitasato (Nagata y cols., 1995; Takahashi y cols., 1996). Este sistema se realizó, con pequeñas modificaciones, para adaptarse a los materiales disponibles. Las superficies donde se generaría el fouling lácteo, en este caso, fueron discos de acero inoxidable 316 2B, de 2 cm de diámetro y 0,1 centímetros de alto, los cuales fueron pre-tratados siguiendo las instrucciones de la sección 5.2.3 de la

norma UNE-EN 13697:2015. Antes de su uso fueron pesaron con una balanza analítica.

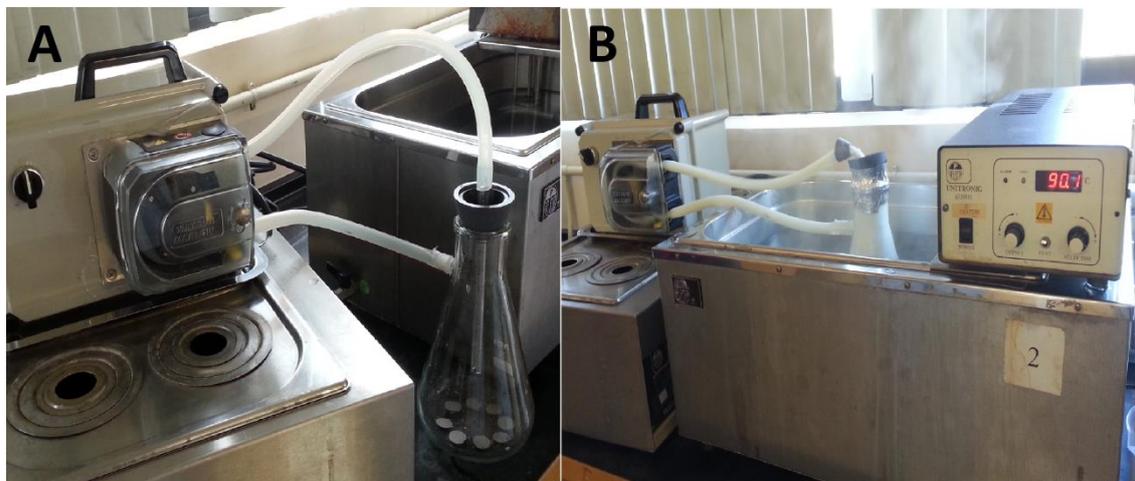


Figura 12. Sistema para producir un modelo de fouling mediante leche en recirculación. A) Discos de acero inoxidable 316 2B en el fondo del matraz Kitasato. B) Sistema en funcionamiento en un baño termostático a 90°C.

El sistema para el ensayo consistió de un matraz Kitasato de 1 L de capacidad, con los discos de acero inoxidable en su interior (Figura 12A). Se hizo un circuito cerrado de entrada y salida de leche del matraz, usando una tubería de silicona y generando el impulso necesario mediante una bomba peristáltica 114 (Watson Marlow, París, Francia). Se llenó el sistema con leche cruda de vaca atemperada a temperatura ambiente y se purgo el sistema para evitar burbujas en la tubería. Una vez purgado todo el sistema, se introdujo el matraz Kitasato en un baño de agua en recirculación Unitronic 6320100 (J.P Selecta S.A, Abrera, España) a 90°C y se encendió la bomba peristáltica (Figura 12B). Se dejó que el circuito cerrado se mantuviera en recirculación constante durante 18 h.

Al final del proceso, los discos fueron recuperados y enjuagados ligeramente con agua desionizada, usando un frasco limpiador. Se secaron en una estufa de aire forzado y se pesaron en una balanza analítica.

1.4. Limpieza del modelo de fouling lácteo.

El primer paso para realizar la limpieza enzimática con los productos CS2 a CS8 (Tabla 2), fue descongelar la alícuota de enzimas contenida en un vial a temperatura ambiente (18-22°C). Después, se añadieron 7,5 ml del vial a un frasco para muestras, como los usados para los enjuagues en la sección 1.4., que contenía 67,5 ml de agua desionizada, para formar la solución de limpieza. A continuación, se ajustó el pH para cada fórmula enzimática mediante sosa cáustica y se añadió el MFM a los frascos.

Los frascos de muestras con la solución de limpieza y un MFM, se introdujeron en un baño agitador Unitronic 320 OR (J.P Selecta S.A, Abrera, España) al máximo de agitación (110 rpm), con el termostato programado para que el agua estuviera en todo momento a 50°C. En el caso del producto de limpieza química (CS1, Tabla 2), se programó el baño para que se mantuviera a 70°C.

Los tratamientos enzimáticos tuvieron una duración de 30 min, realizados en dos etapas de 15 min. Durante la primera etapa, los frascos estuvieron en agitación continua a 50°C, para representar el flujo del producto de limpieza por las instalaciones en condiciones prácticas. Una vez finalizada la primera etapa, se detuvo la agitación del baño y se retiraron los frascos y los MFM de las soluciones de limpieza. Los MFM se introdujeron en un nuevo frasco para muestras, y se realizó un enjuague de acuerdo a la sección 1.4., usando 30 ml de agua desionizada a 50°C.

Una vez terminado el enjuague, se reintrodujo el MFM al frasco con la solución limpiadora y se aplicó otra etapa de 15 min en el baño a 50°C en agitación continua. Una vez terminada la última etapa de agitación, se realizó un nuevo enjuague, como el realizado anteriormente.

Al finalizar el último enjuague, se hizo un lavado suave usando un frasco lavador y se dejó secar, el MFM limpiado, en una estufa de aire forzado a 50°C.

Una vez que los MFM se secaron, se pesaron usando una balanza analítica.

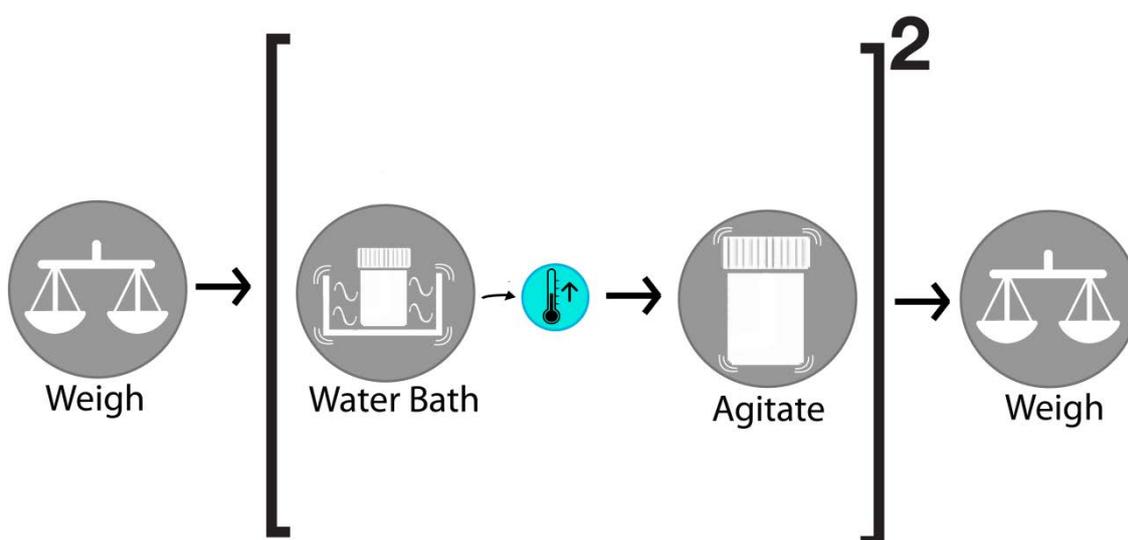


Figura 13: Esquema simplificado del protocolo de limpieza de los modelos de fouling lácteo (MFM) usando productos con base enzimática.

En el caso de una limpieza química, el protocolo se realizó de la misma forma, exceptuando que el tiempo de contacto de la solución limpiadora fue de 45 min, dividido en tres etapas de 15 min, con un enjuague de 1 min después de cada etapa en el baño con agitación a 70°C.

Una vez el MFM se secó, se determinó su peso usando una balanza analítica.

Todo este proceso se resume en la figura anterior (Figura 13), siendo todo el proceso, tres acciones distintas: pesar, incubaciones en el baño termostático agitado y los enjuagues en agua caliente y agitación.

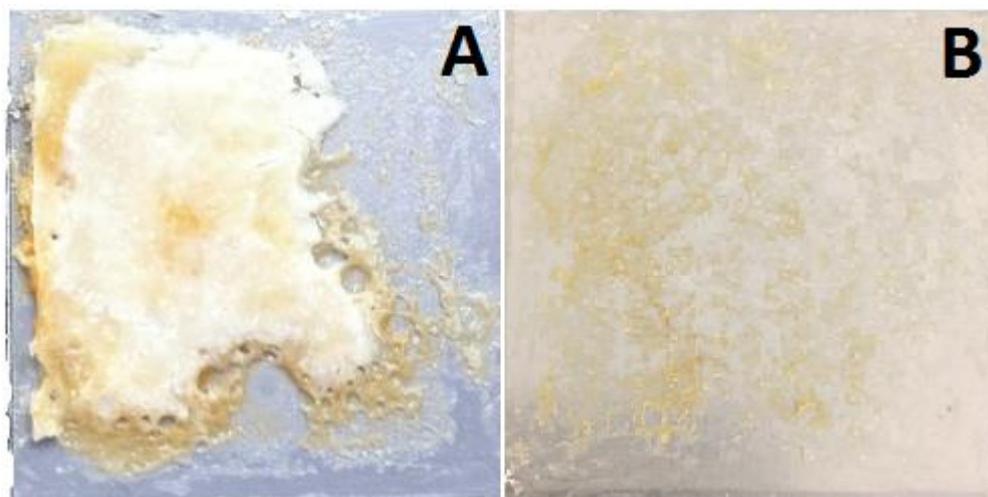


Figura 14: A) Modelo de fouling lácteo (MFM) B) MFM después de la limpieza enzimática.

1.5. Monitorización de la limpieza del fouling lácteo.

El seguimiento de los procesos de limpieza de las instalaciones es una utilidad de gran interés industrial, dada la importancia de saber en qué punto de la limpieza se encuentra el sistema.

Dado que, al estar limpiando unas instalaciones, sin poder observar, ni la cantidad de suciedad acumulada, ni la cantidad de suciedad movilizada; el seguimiento estricto de un protocolo de limpieza, siempre idéntico, para una situación que puede no ser siempre la misma, provoca que se realicen limpiezas muy agresivas para cubrir las situaciones más graves o que, realizando un protocolo de limpieza estándar, queden restos sin eliminar.

En este caso se estableció el uso del análisis de la turbidez del agua, como indicador del punto de desarrollo de la limpieza, un método rápido, barato y fácil de realizar. Para ello se usó un turbidímetro Densimat (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia), que proporciona los datos en unidades McFarland de turbidez.

Cada vez que se realizó un enjuague, durante las limpiezas de los MFM, se realizó una medición de la turbidez usando 8 ml de la solución de limpieza en un tubo de cristal, apto para su uso en un Densimat. Posteriormente se devolvía el líquido analizado para no continuar con una menor cantidad de solución limpiadora.

1.6. Procesado estadístico de los datos.

Todos los datos obtenidos en este estudio fueron procesados usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) y el paquete estadístico IBM SPSS 23 (IBM Corp, Armonk, NY, USA). Los resultados fueron analizados siguiendo una prueba de One-way ANOVA, con un contraste *a posteriori* de Tukey y el T-test, con la prueba de Welch, para las 42 muestras analizadas, después de su lavado con productos enzimáticos o químicos. El nivel de significación, para todos los análisis estadísticos fue de $p \leq 0,05$.

2. Resultados y discusión.

2.1. Producción de fouling lácteo en condiciones de ciclos de secado.

Una vez se consiguió crear suficientes MFM y fueron usados para los tratamientos de limpieza distintos se consiguieron los siguientes datos.

Tabla 3: Medias del peso acumulado durante la producción de MFM a 0, 4 y 8 h de producción (en gramos) (n=64. Superficies de 25 cm²).

Ciclos	Tiempo (horas)	Fouling total (gramos)	mg/cm ²
0	0	0	0
5	4	1,20±0,27	48
10	8	1,32±0,45	52,8

La eficacia en la producción de fouling con este nuevo método se calculó de acuerdo a la diferencia entre el peso inicial y el peso final del MFM seco, después de los diez ciclos de adición y secado de la leche cruda (Tabla 3). En una jornada de trabajo se logró un depósito de fouling lácteo en las superficies acero inoxidable de 1,32 g (52,8 mg/cm²) de media (Tabla 3).

El aspecto visual exterior del modelo de fouling lácteo, una vez finalizado el ensayo (Figura 14A), fue de un color blanco marfil e, internamente, más tostado en la zona en contacto con la superficie. La coloración más intensa en la zona cercana al metal se podría dar por una acumulación de compuestos derivados de la caramelización de los componentes de la leche, de los carbohidratos (lactosa) y las proteínas (Morales y cols., 1995) en el caso de la leche líquida tratada térmicamente. Así mismo, se observó que el color tostado comenzó a aparecer a partir del sexto ciclo de adición y secado de la leche, a la par que en la superficie del fouling aparecían unas gotas translúcidas, que se podrían deberse a la acumulación de la grasa de la leche en la superficie.

Los resultados indican que el tiempo para producir una cantidad suficiente de fouling lácteo, para poder evaluar los productos de limpieza, fueron de 8 h (10 ciclos de adición y secado) (Tabla 3).

El trabajo se centró en ese tiempo, dado que un aumento del tiempo de trabajo no suponía un incremento en la cantidad de fouling adherido. A partir de las 4 h la ganancia era menor y, a partir de las 8 h, se disponía de suficiente cantidad de fouling depositado para determinar la eficacia de las soluciones de limpieza en este estudio. Además, las 8 h de formación de fouling se adaptaba a un ciclo de producción diario, economizando las horas de trabajo para obtener los MFM para su limpieza posterior. Esto optimizaba el trabajo, ya que en un día de trabajo era posible producir una tanda suficiente de MFM secos, para las posteriores pruebas de la semana.

La cantidad de producto adherido a la superficie de acero inoxidable podía depender, en cierta medida, de la composición de la leche cruda de cada lote usado. Al provenir directamente de la granja, podía haber variaciones estacionales en la leche producida, difíciles de controlar en este estudio.

2.2. Producción de fouling lácteo en condiciones de recirculación como control.

Los resultados del método alternativo para la producción de fouling lácteo, usando un matraz Kitasato con una bomba peristáltica, mostraron que la leche tenía un color parduzco después de 18 h de recirculación continua.

Así mismo, todos los discos de acero inoxidable, en el interior del matraz, estaban recubiertos por una capa espesa de fouling color marfil, débilmente adherida, ya que con un ligero enjuague se desprendía de los discos. Estos, una vez secos y pesados en la balanza analítica, llegaban a acumular 0,001 g de fouling de media.

2.3. Limpieza de los modelos de fouling lácteo (MFM).

A la hora de probar nuevos productos o estrategias, para la limpieza de fouling, se empleó un nuevo modelo realizado en laboratorio. Para ello fue necesario probar el sistema con un producto control, usado en la industria y con buenos resultados para eliminar este tipo de residuos. En este estudio, se usaron como control dos productos comerciales para la limpieza industrial. Uno de ellos es un producto químico con base alcalina (CS1) y otro uno con base enzimática (CS2).

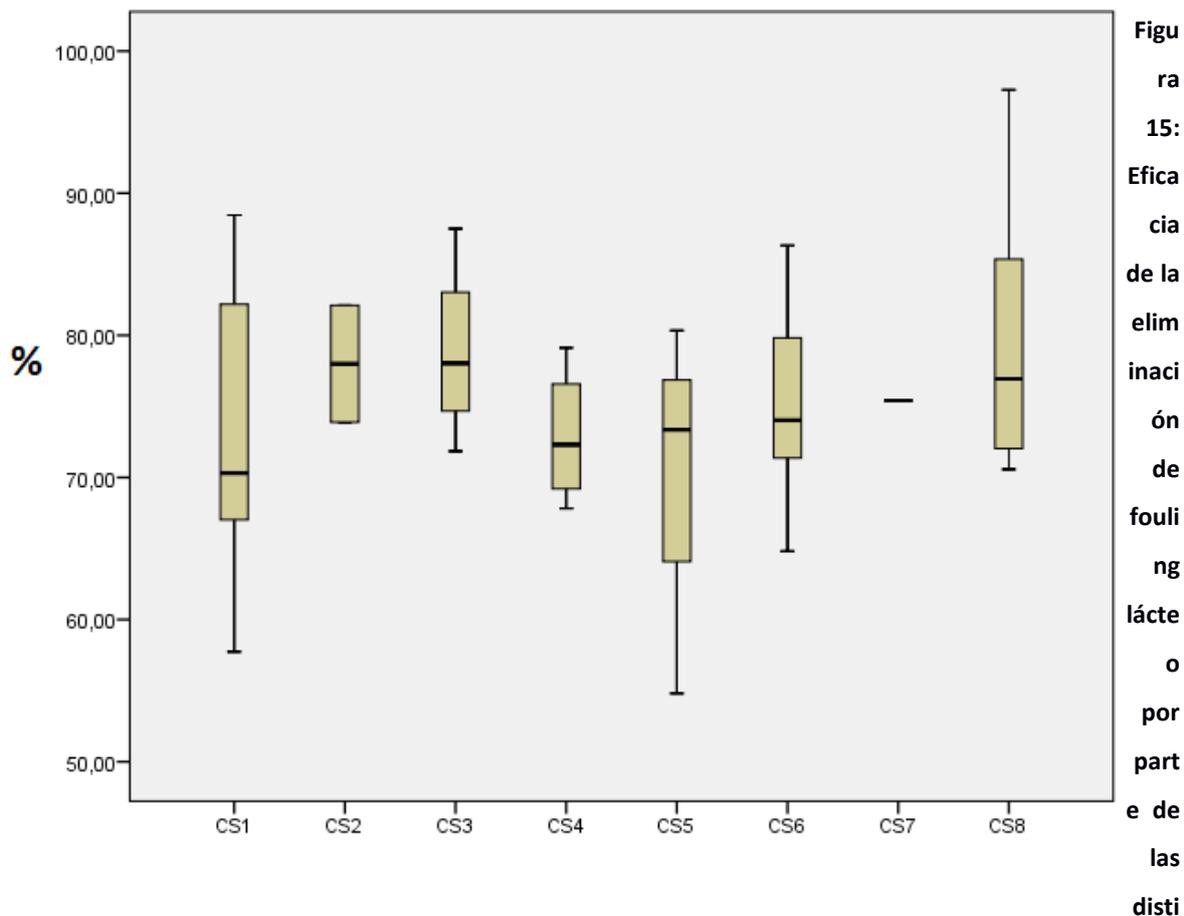


Figura 15: Eficacia de la eliminación de fouling lácteo por parte de las distintas soluciones de limpieza, resultados en porcentaje (%), mediana representada por la división de la barra.

Las muestras analizadas (Figura 15) mostraron una gran variabilidad, propia de una matriz con una composición muy poco homogénea, como es el fouling lácteo. Por ello, para lograr observar diferencias estadísticas, entre los distintos productos de limpieza, sería necesario un tamaño de muestra mucho mayor. El tiempo necesario para obtener el fouling y la carga de trabajo para comparar todos estos parámetros no lo hicieron posible. Sin embargo, si es posible ver aquel producto que posee una máxima eficacia, de aquellos con menor nivel funcional y mayor variabilidad.

Los resultados muestran (Figura 15) que la efectividad media del producto de referencia CS1 fue de 73,31% eliminando el fouling del modelo de laboratorio

MFM. La efectividad media, para la eliminación del fouling formado del producto CS2, fue del 77,99%.

Los MFM también se limpiaron usando productos enzimáticos de nueva formulación. Este enfoque a la problemática del fouling ya ha sido probado con anterioridad. Graßhoff (2002) empleó distintas soluciones de limpieza enzimáticas para eliminar el fouling lácteo, en algunas de las fórmulas desarrolladas en esta tesis se empleó la misma proteasa utilizada en este estudio.

Las ventajas de usar productos enzimáticos están relacionadas con la eficacia en la eliminación de residuos, la generación de un menor volumen de aguas residuales y una reducción en la energía consumida. Esto se debe a una reducción en los requerimientos en la temperatura del proceso y a una menor necesidad de productos químicos. A esto hay que añadir una menor afectación medioambiental respecto a los productos químicos tradicionales. Por ejemplo, los productos CS1 y CS2 se aplicaron a la temperatura y tiempo recomendados por el fabricante. La diferencia entre estos tratamientos era de 20°C, para los enzimáticos, con una duración 15 min inferior. Los resultados también indican que los mejores resultados fueron para las fórmulas enzimáticas CS3 y CS8, con un 78,85% y 80,43% de eficacia media, respectivamente. Ambas fórmulas contaban con una composición similar de amilasa, proteasa y un agente tensoactivo, pero con un pH distinto. Los valores de eficacia limpiadora más bajos, en la eliminación de fouling lácteo, correspondieron a los productos CS4 y CS5, con un 73,89% y 69,5% de eficacia, respectivamente, que actuaron a un pH de 9,5.

Una vez realizada la limpieza de los MFM, fue evidente el alto grado de limpieza y desincrustación que se había logrado a baja concentración de enzimas en la

solución de limpieza y con una rebaja sustancial de pH, tiempo y temperatura respecto al protocolo químico.

Con la limpieza enzimática fue posible reducir la carga de fouling, aproximadamente entre un 65% (CS6) en el peor de los casos y un 97% (CS8) en el mejor de ellos. Empleando el producto químico control (CS1), la reducción se mueve aproximadamente entre el 57% y el 88%. Siempre usando los modelos de laboratorio como elemento a limpiar.

2.4. Monitorización de la limpieza de la limpieza de fouling lácteo.

La monitorización de la solución de limpieza en el proceso, usando enzimas o el producto químico, fue un método fácil y rápido para obtener lecturas inmediatas de la turbidez del proceso. Al inicio de la limpieza, la solución era transparente, pero durante el transcurso del proceso, el líquido se fue enturbiando, a medida que se desprendía el fouling de las superficies.

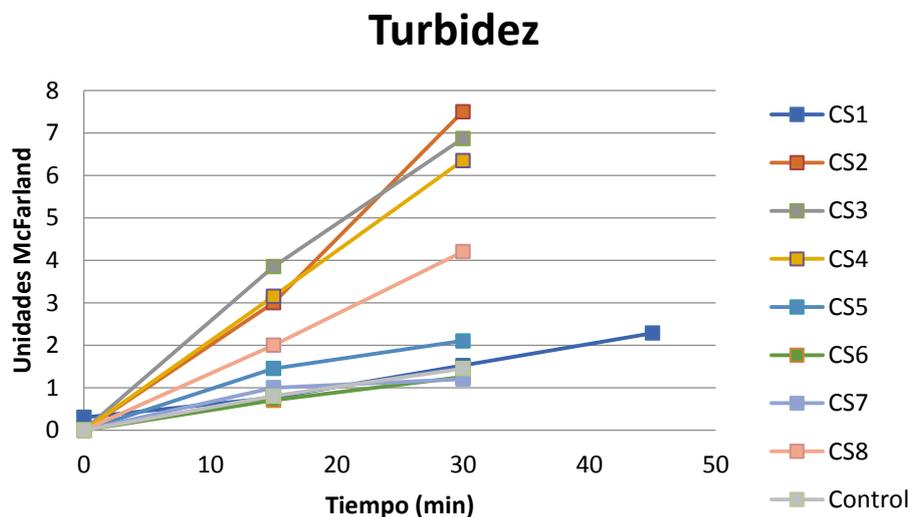


Figura 16: Turbidez de distintas soluciones de limpieza en unidades McFarland de turbidez.

Los datos reflejados en el gráfico superior (Figura 16) representan los valores de turbidez obtenidos, a los tiempos analizados, durante el proceso de limpieza

realizado, con los productos ensayados. Hay una buena correlación entre el nivel de turbidez y el momento de la limpieza donde se encuentra el sistema. Siempre hay un aumento de la turbidez, siendo el valor inicial 0, por ser un producto transparente. A los 15 min ya se detectó cierta turbidez en la solución de limpieza, mientras que a los 30 min, el valor siempre fue superior a los demás puntos. Para el tratamiento que continuó hasta los 45 min, se mantuvo la observación, detectándose un incremento progresivo de la turbidez, durante el transcurso de la limpieza.

Durante el empleo del producto CS2 en 30 min tenía un nivel de turbidez tan elevado que el Densimat no pudo obtener una lectura, al estar por encima del rango de lectura del aparato ($\geq 7,5$ unidades McFarland).

Se intentó medir la turbidez durante las etapas de enjuague, pero la cantidad de partículas en suspensión, debido a la agitación, saturaba el medio, impidiendo la lectura correcta de la solución.

El control negativo, se realizó con lavados donde sólo se usó agua a pH 9,5 y a 50°C. Esta solución tuvo una eficacia mínima, como se esperaba. En cuanto a su turbidez, da un resultado muy parecido a la eficacia de eliminación, siendo el valor más bajo entre todos los productos de limpieza probados.

Mediante la monitorización de la turbidez, en los lavados, se pudo observar la dinámica de limpieza, con un incremento de la transferencia de los residuos de las superficies a la solución de limpieza. Sin embargo, no se pudieron correlacionar los datos obtenidos con la eficacia de limpieza, dado que el residuo puede llegar a ser muy heterogéneo en su composición y las enzimas pueden afectarle de forma distinta, pudiendo soltarse fragmentos de tamaño variable, que modificaban la turbidez medida, de forma poco comparable.

V: Estudio de la composición del fouling lácteo y posterior perfeccionamiento de un nuevo tratamiento enzimático para su eliminación

1. Material y métodos.

En este estudio se procedió a adaptar el modelo de generación de fouling a escala de laboratorio, para facilitar su análisis mediante diferentes técnicas de microscopía. Se realizaron diferentes ensayos de limpieza, utilizando el producto comercial alcalino (CS1) y comparándolo con la nueva fórmula enzimática desarrollada en este trabajo (CS8m).

1.1. Fuente del fouling lácteo.

El modelo de fouling lácteo (MFM) se produjo a partir de leche entera cruda de vaca, suministrada a 5°C por una granja lechera (Granja Can Bordoí, Sant Antoni de Vilamajor, Cataluña, España) y guardada en refrigeración hasta el momento de uso.

1.2. Superficies para el fouling lácteo.

La modificación del modelo se debió a los diferentes requerimientos de peso y tamaño, necesarios para poder procesar las muestras mediante las diferentes técnicas de microscopía.

Para ello, se siguió utilizando acero inoxidable (discos de 2 cm de diámetro tipo 316 grado 2 B) para asegurar la mínima rugosidad donde se pudiera acumular residuos, durante la producción del fouling lácteo. Esto nos permite modificar la superficie total de 25 cm² a sólo 3,14 cm².

Los discos se limpiaron como se realizó en la anterior sección, mediante el procedimiento descrito en la norma UNE-EN 13697:2015). Posteriormente se

conservaron, en condiciones estériles, dentro de bolsas termoselladas hasta su uso. Previamente, al inicio de los experimentos, se determinó el peso de los discos con una balanza analítica.

Para formar las paredes del disco, con la finalidad de no perder leche en el sistema, se usó la cinta adhesiva termoresistente de aluminio, anteriormente descrita. Esta vez, en porciones de 4 cm de lado. Una vez retirada la lámina protectora de la cinta adhesiva de aluminio, se colocó un disco sobre la cara adherente de la cinta y, el resto del cuadrado de aluminio, se levantó para que se adhiera a los laterales del disco. Luego se recortó el sobrante de cinta adhesiva, dejando una pared de una altura regular de 0,6 cm.

Al terminar de montar las estructuras, se volvió a rotular las superficies y se pesaron de nuevo en una balanza analítica.

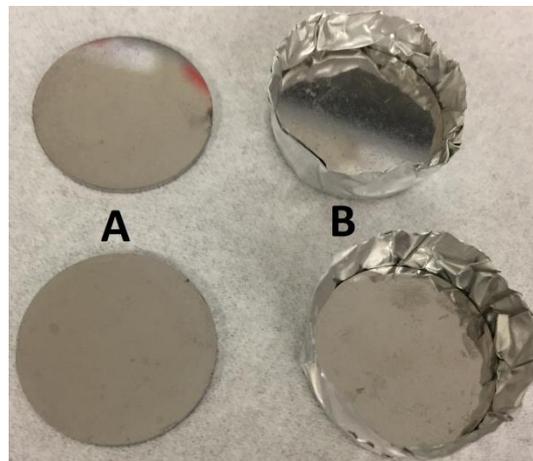


Figura 17: Superficies para la producción de fouling. A) Discos de acero inoxidable (2 cm de diámetro) tipo 316 y pulido de grado 2B. B) Contenedores para la producción del modelo de fouling adaptado a microscopía con paredes de 0,6 cm de altura.

1.3. Mejora de la solución enzimática para eliminar fouling lácteo.

Una vez seleccionada la fórmula enzimática de limpieza a usarse en este experimento (CS8 del anterior estudio, tabla 2), se analizaron las curvas de actividad de cada una de las enzimas (información proporcionada por los fabricantes) utilizadas en la fórmula.

Para ello, se observaron las curvas de actividad y se delimitó la zona de la gráfica donde las enzimas tenían una actividad mínima de un 80%. A partir de estos datos se modificó el pH y la temperatura usada en la fórmula para garantizar las condiciones óptimas.

Es importante recordar, que la información proporcionada por las curvas de actividad, está creada a partir de estándares para ser catalizados por las enzimas. En el caso de la amilasa, fue analizada usando una solución de almidón. Mientras que la proteasa se probó utilizando una solución de albumina de suero bovino (BSA). Ninguno de ellos es un compuesto de la leche, por lo que los resultados pueden no ser idénticos. No obstante, definen los límites de actividad de las enzimas empleadas.

Las condiciones de uso se modificaron en base a las curvas de actividad, a fin de incrementar la eficacia, respecto a los resultados obtenidos en el primer estudio. Para ello, se incrementó la temperatura un 10% (de 50° a 55°C) y se rebajó el pH de 9,5 a 8,5.

Otras medidas adoptadas para la mejora de la acción de la fórmula enzimática fue usar un medio tamponado, a fin de mantener estable, durante el mayor

tiempo posible, el pH de la solución de lavado. Esto evitará fluctuaciones en las condiciones óptimas de trabajo y, consecuentemente de su actividad.

Esto es importante debido a que, al degradarse las proteínas, se pueden liberar compuestos nitrogenados que tienden a alcalinizar. Por otra parte, al degradarse algunos compuestos derivados de la caramelización, podría haber una tendencia a la acidificación de la solución de limpieza. Por estos motivos, la presencia de un producto tamponador aseguraría la estabilidad de la reacción.

Se evaluaron tres posibles productos tamponadores para su uso con enzimas:

- Tampón borato salino (BBS) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en forma de tabletas, listas para ser usadas, después de ser homogenizada en 500 ml de agua desionizada, con un pH alrededor de 8,2.
- Tampón carbonato-bicarbonato (CBB) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) en forma de cápsulas, listas para ser usadas, después de ser homogenizada en 100 ml de agua desionizada, con un pH alrededor de 9,6. Este tampón se diluyó en una proporción 1/16, en agua desionizada, para alcanzar un pH de 8,45.
- Tampón borato-ácido clorhídrico (BB-HCl), siguiendo el protocolo descrito por Lurie (1975). Consistió en una mezcla de dos soluciones distintas, donde la proporción entre las dos se traduce en el pH deseado. Este pH final puede oscilar entre 7,8 y 9,2. Para alcanzar el pH 8,5, fue necesario mezclar 65,25 ml de la solución 1 en un matraz aforado de 100 ml y enrasado con solución 2 para obtener el tampón. Las soluciones fueron:
 - Solución 1: Tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) (0,05 mol/L) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), disuelto en agua desionizada.

- Solución 2: ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N (Panreac, Castellar del Vallès, España).

1.4. Productos de limpieza.

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en los experimentos anteriores de limpieza, usando soluciones de limpieza con enzimas, contra MFM y, especialmente el aspecto del fouling, donde hay zonas que tienden a un color parduzco, se pensó en la posibilidad de que existiera caramelo que actuara como cohesionador y promotor de la adhesión del fouling. Por ello, para poder eliminarlo, se eligió un producto enzimático con buenos resultados contra los MFM, la fórmula CS8.

La fórmula elegida contenía proteasa y amilasas para eliminar, tanto a las proteínas como al caramelo formado sobre la superficie metálica, conformando el fouling lácteo.

A su vez, se eligió un producto químico alcalino comercial (CS1, Tabla 2 y 4) como control positivo en esta adaptación del modelo de fouling de laboratorio, como también se hizo anteriormente. El producto fue diluido en agua desionizada a la concentración recomendada (6%) por el fabricante. En la tabla 4 se describe los productos usados para la limpieza de los modelos de fouling adaptado, sus concentraciones, temperatura, pH y tiempo de uso.

Tabla 4: Productos de limpieza química (CS1) y enzimática (CS8m) usados en este estudio contra el fouling lácteo adaptado.

Soluciones de limpieza (CS)	Componentes y concentraciones final	Temperatura de trabajo	pH de trabajo	Tiempo de limpieza (minutos)
CS1	6%	70°C	10-12	45
CS8m	0,0012% proteasa, 0,0010% amilasa, 0,25% tensoactivo y 99,74% de tampón.	55°C	8,5	30

El producto enzimático CS8m fue producido diez veces más concentrado que la concentración de uso final, ya que a una mayor concentración, los pequeños volúmenes se pueden conservar mejor y facilitan su manejo durante su posterior uso. También se sustituyó el agua desionizada para diluir los componentes del CS8m por tampón a pH 8,5. Para esto, el producto enzimático se dispensó 3,5 ml de la solución enzimática concentrada, en viales estériles de 5ml y se conservaron a -18°C hasta su uso. Así, cuando se realizaban los ensayos de limpieza enzimática, solo fue necesario descongelar los viales.

1.5. Producción del modelo de fouling lácteo adaptado a microscopía (AMFM).

El modelo de fouling lácteo para microscopía (AMFM) se adaptó a partir del protocolo usado anteriormente en la sección IV.1.4. Producción del modelo de fouling lácteo (MFM). La adaptación se basó en la relación entre el volumen de leche total, el área de las superficies metálicas usadas en el MFM, con el área de las superficies que se usarían en la adaptación. Por ello, para el área de un disco de 2 cm de diámetro, se deberían emplear 4 ml de leche cruda total, en etapas de 0,4 ml en cada fase de adición y secado.

El primer paso del procedimiento fue el pesado de los contenedores (superficie metálica más cinta de aluminio), precalentados a 90°C, en una estufa de aire forzado, para producir fouling lácteo tipo A, en una balanza analítica. Una vez conseguida la temperatura de trabajo, se añadieron 0,4 ml de leche cruda en cada contenedor y se volvió a introducir en la estufa. El tiempo de secado fue de 30 min, sensiblemente menor al usado en el MFM (45 min). Esta reducción se debió a la menor cantidad de líquido en cada superficie metálica, y a una mayor superficie de contacto. Cada etapa de secado de 30 min proporcionaba un residuo seco de aspecto similar al obtenido con los MFM.

El procedimiento para la producción de AMFM se asemejaba al de los MFM, pero con menores volúmenes y tiempos más cortos. Después de cada cinco etapas de adición y secado de leche, se procedió a un enjuague, usando 4 ml de agua desionizada a 50°C, en un frasco para muestras (38 x 65 mm), donde el contenedor para el AMFM entraba holgadamente. El frasco fue agitado con un agitador de tipo Vortex durante 50 s. Una vez acabado el enjuague, se volvieron a precalentar los contenedores a 90°C. Este proceso se repitió durante 5 ciclos de adición de leche y secado, con un enjuague final.

Finalizado todo el proceso, se dejó secar los modelos de fouling adaptados (AMFM) en la estufa de aire forzado parada, aprovechando el calor residual de secar la leche para hacer fouling, aproximadamente a unos 50°C. Una vez totalmente secos, los modelos de fouling adaptado (AMFM) se pesaron usando una balanza analítica, tanto con la cinta de aluminio (Figura 18A) como sin ella (Figura 18B).

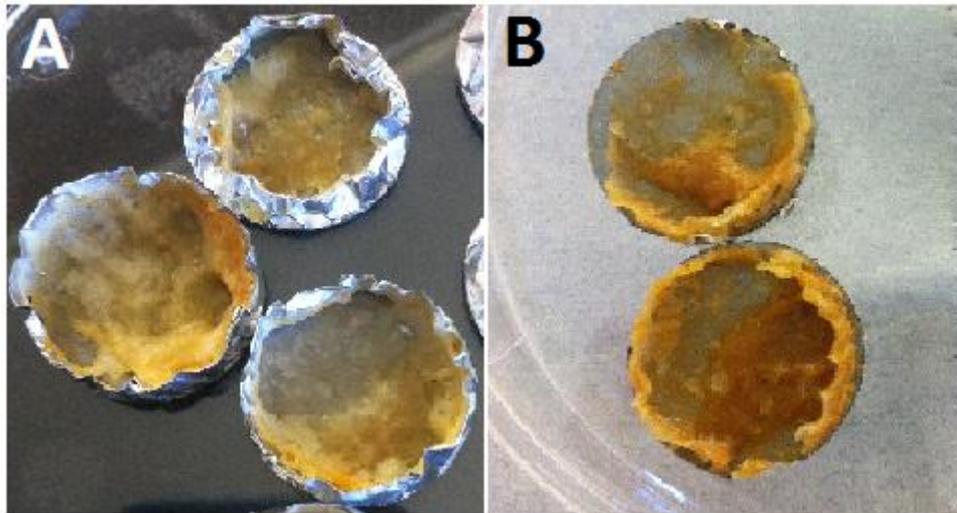


Figura 18: Modelos de fouling lácteo adaptado (AMFM), A) Después del proceso de producción, B) aspecto del AMFM después de la última pesada, preparados para su limpieza o para ser analizado.

1.6. Prueba de los distintos tampones para la limpieza enzimática.

Los tres tampones fueron probados bajo situaciones similares a los del protocolo de limpieza enzimática, midiendo el pH a distintos tiempos, concentraciones y temperaturas. El pH inicial de cada solución tampón se midió usando un pHmetro micro pH 2000 (Crison Instruments, Barcelona, España) a temperatura ambiente (18-22°C). Posteriormente, se medía el pH a los 30 min y 1 h de inmersión en un baño con agitación Unitronic 320 OR (J.P Selecta S.A, Abrera, España) y ajustado a 55°C. A continuación, se dejaron atemperar las soluciones tampón, a temperatura ambiente, y se volvieron a medir los pH a las 2,5 horas del inicio de las mediciones.

Adicionalmente, se comprobó hasta qué extremo se podía diluir cada solución tampón, antes de que perdieran su funcionalidad, para poder reducir los costes ante un posible escalado de los procesos de limpieza enzimática específica, para fouling lácteo a nivel de planta piloto.

Estas diluciones se produjeron con agua de red de Cerdanyola del Vallès (Aigües de Barcelona, Barcelona, España), para tener unos datos lo más cercanos a la realidad posible. Las soluciones tampón fueron producidas también con agua de red para este experimento. Se realizaron diluciones de 1/2 sucesivas hasta seis veces (hasta 1/64) a temperatura ambiente, para comprobar hasta qué punto se podía diluir la solución manteniendo sus propiedades.

1.7. Limpieza de los modelos de fouling lácteo adaptado (AMFM).

Se adaptó el protocolo de limpieza de la sección IV.1.6 Limpieza del modelo de fouling lácteo para los AMFM (Figura 3).

Para los ensayos de limpieza enzimática de los AMFM, primero se dejó atemperar los viales congelados de solución enzimática concentrada (x10). Para los tratamientos químicos, se retiró todo el aluminio adherido a los AMFM, para evitar alteraciones en la limpieza como consecuencia de la disolución del aluminio por el NaOH del producto CS1.

Una vez que los productos de limpieza estuvieron listos para usarse, se diluyeron las enzimas de los viales descongelados con 31,5 ml de solución tampón y se añadió el AMFM.

Las soluciones de limpieza se dispensaron en un frasco para muestras de 50 ml, donde el AMFM entró holgadamente. Los frascos se introdujeron en un baño agitado, a 55°C para la limpieza enzimática, y a 70°C para la limpieza química, al máximo de agitación posible.

Una vez se introdujeron los frascos con los AMFM en un baño agitador Unitronic 320 OR (J.P Selecta S.A, Abrera, España) al máximo de agitación (110 rpm), con el termostato programado para que el agua estuviera en todo momento a la temperatura ideal para cada limpiador; cada 15 min se retiraron los frascos, apartando los AMFM de la solución de limpieza y se introdujeron en un nuevo frasco para muestras con 5 ml de agua desionizada a 50°C y se agitó con un agitador tipo Vortex al máximo de potencia durante 50 s. Esta etapa de agitación era equivalente a la etapa de enjuague industrial. Terminado este enjuague, se volvieron a introducir los AMFM en las soluciones de limpieza y se realizó otra etapa de 15 min en el baño agitador.

El tiempo total del tratamiento enzimático fue de 30 min, dividido en dos etapas de 15 min, seguida cada una de las etapas con una etapa de enjuague de 50 s. Para los tratamientos químicos, se necesitan 45 min, en tres etapas de 15 min, seguida cada una de ellas por una etapa de enjuague de 50 s.

Una vez realizada la limpieza, se dejaron secar los AMFM en una estufa de aire forzado y se pesaron en una balanza analítica.

Los AMFM, que se limpiaron con el proceso de limpieza descrito en esta sección, se utilizaron para caracterizar la composición y estructura de los residuos de cada tratamiento de limpieza.

1.8. Estudio de la morfología y topografía del fouling lácteo.

Para el estudio del aspecto microscópico de la superficie del fouling en los AMFM, se usó un microscopio electrónico de barrido (SEM) EVO MA 10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania), sin ningún tipo de cobertura metálica de las muestras.

Una vez introducida la muestra en la columna de vacío, se programó el microscopio para que su funcionamiento tuviera una presión variable en el interior de la columna, dado que las muestras no habían sido desecadas mediante secado del punto crítico (donde el agua de la muestra se sustituye por alcohol o acetona y éstos a su vez por CO₂ líquido), dada la dureza de la muestra, y para evitar el máximo de manipulación del modelo de fouling lácteo a la hora de observar su morfología.

La imagen se creaba mediante el disparo de un haz de electrones sobre la muestra y, dependiendo del tipo de detector usado, se puede detectar distintos tipos de electrones que serán reflejados por la muestra a través de un haz. Los detectores serán los encargados de convertir la señal recibida en píxeles de una imagen digitalizada. Con esta técnica se pudo llegar a un aumento de 1000 veces, antes de perder definición de la superficie de los modelos de laboratorio.

Para el estudio de la rugosidad de las superficies cubiertas de fouling, se usó un microscopio confocal óptico Leica DCM 3D (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España) para hacer una medición automatizada y digital en tres dimensiones de las muestras.

Se realizó una secuencia de imágenes a distinta longitud focal, para obtener una batería de distintos planos. Los datos obtenidos se procesaron usando el software especializado Leica Map Premium (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España) para generar distintas representaciones de la información obtenida, aportando profundidad a la suma de distintos planos bidimensionales (2D). Con la suma de distintos planos bidimensionales se obtiene la imagen tridimensional del objeto de estudio.

1.9. Estudio de la fracción orgánica del fouling lácteo.

1.9.1. Análisis de la composición de la leche cruda de vaca mediante NIRS.

Se midieron las cantidades de los distintos componentes de la leche (proteína bruta, grasa bruta, y sólidos totales) mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) NIR 5000 (1100-2500 nm) (FOSS NIRSystems, Barcelona, España). Con la obtención de un perfil espectroscópico de la muestra de leche, éste se puede comparar con los valores de un estándar producido por un gran número de repeticiones de un mismo tipo de muestras (en este caso, leche cruda de vaca). Esas muestras analizadas, para producir el patrón estándar, fueron previamente analizadas mediante técnicas de referencia tradicionales (Kjeldahal para proteínas, Gerber para grasas o difracción para lactosa). De esta forma se consiguió correlacionar los valores de cada pico dado por la espectroscopia, en longitudes de onda del área del infrarrojo, con un valor de concentración de cada componente a analizar.

Esta técnica tiene unas grandes ventajas, al ser una metodología no destructiva, con gran capacidad de análisis de muestras, pudiendo obtener resultados de forma rápida y con un bajo coste. En su contra, se tiene que producir un patrón estándar con el perfil espectroscópico del tipo de muestra deseada, antes de poder procesar las muestras a gran velocidad. Además, entre lectura y lectura de muestra, se tiene que recalibrar la maquinaria con un patrón interno comercial.

Todos los lotes de leche cruda usada para producir AMFM se analizaron por triplicado mediante NIRS, en el laboratorio de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la UAB.

1.9.2. **Microscopía de epifluorescencia directa (DEM) de los AMFM.**

El microscopio de epifluorescencia directa (DEM) funciona a partir de la iluminación de las muestras con luz UV proveniente de la fuente de luz, en una longitud de onda bastante amplia. Un conjunto de filtros y espejos delimitarán la longitud de onda con que se iluminará la muestra.

La luz incidirá sobre los fluorocromos de los materiales de la muestra y de los colorantes fluorescentes aplicados. Así, estos emitirán en una longitud de onda mayor a la que se excitaron las moléculas fluorescentes. La emisión de luz, por parte de la muestra, será captada a través del objetivo y será filtrada por uno de los filtros del revolver del microscopio, hasta el fotodetector o las lentes del visor.

Esta tecnología aporta un mayor contraste entre materiales autofluorescentes y materiales inertes ante la luz UV. También sirve en conjunción con colorantes fluorescentes que se unirán de forma selectiva a determinados sustratos, como el caso de Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC), que tiene afinidad por los residuos específicos de las cadenas de aminoácidos de las proteínas, o el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), que tiene afinidad por el ácido desoxirribonucleico (DNA), tiñendo zonas específicas de las muestras, que ayudarán a observar la muestra y a la vez a identificar los componentes en la misma.

En este experimento los componentes de la leche, una vez adheridos sobre la superficie metálica, se analizaron mediante el uso de un microscopio mecanizado de fluorescencia BX51 (Olympus Optical, Tokyo, Japón) equipado con una lámpara de mercurio como fuente de luz UV.

Se seleccionaron una batería de tres colorantes diferenciales fluorescentes (Tabla 5). Se aplicaron simultáneamente a los AMFM, con un periodo de incubación en condiciones de oscuridad durante 25 min.

Tabla 5: Colorantes fluorescentes usados en microscopía de epifluorescencia directa (DEM).

<u>Colorante fluorescente</u>	<u>Fabricante</u>	<u>Concentración</u>	<u>Volumen usado</u>	<u>Compuesto diana</u>	<u>Color</u>
Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	1mg/ml	10 µl	Proteínas	Verde
Rojo Nilo (NR)	Sigma-Aldrich, St Louis, USA	0,1 mg/ml	10 µl	Lípidos	Rojo
Concanavalina A-Alexa Fluor 350 (ConA 350)	Thermo Fisher/Molecular Probes, Eugene, USA	0,3mg/ml	20 µl	Carbohidratos	Azul

Todos los colorantes se mezclaron de forma homogénea en 60 µl de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 0,1 M (Panreac, Castellar del Vallès, España), para evitar la dimerización del colorante Con A-350 (siguiendo las recomendaciones del fabricante). Cada mezcla de 100 µl con bicarbonato y colorantes se añade de forma homogénea a cada muestra.

La toma de imágenes de microscopía y su procesamiento se realizaron con el software de CellSense (Olympus Optical, Tokyo, Japón). Los filtros seleccionados para este experimento fueron, uno azul para Con A-350 y uno mixto verde-rojo para ser usado simultáneamente en los colorantes FITC y Rojo Nilo.

1.9.3. **Microscopio confocal láser de barrido (CLSM) de AMFM y los residuos de la limpieza.**

El microscopio láser confocal (CLSM) funciona con unos principios parecidos a los del DEM, pero aportando mejoras como una iluminación más precisa de los fluoróforos, tanto en su longitud de onda de excitación, como de la zona a analizar, por el uso de láser en vez de una fuente de luz externa. También limita

la captación de luz emitida fuera del área enfocada, con lo que se gana definición en la imagen tomada.

El uso de estas características ayuda a captar series de microfotografías a distintos planos de profundidad en la muestra y, mediante software específico, se pueden juntar todos los planos en un solo modelo 3D.

En este estudio, la composición espacial y la microestructura del fouling lácteo, usando CLSM, se realizó mediante un microscopio confocal láser Spectral Multiphoton Leica TCS SP5 (Leica Microsistemas S.L.U., Barcelona, España). Esta tecnología permite buscar la composición de las capas internas de las muestras mediante un software especializado IMARIS (Bitplane, Zúrich, Suiza), recreando la composición tridimensional (3D) y juntando grupos de microfotografías en un solo modelo 3D.

Para el estudio microscópico de la microestructura de los AMFM se emplearon los colorantes diferenciales usados para DEM (Tabla 5). Cada AMFM fue teñido en el interior de una cápsula de cultivo celular μ -Dish IBIDI (IBIDI GmbH, Planegg, Austria). Una vez introducida la mezcla de colorantes y bicarbonato, cada muestra se incubó durante 16 horas en una cámara de humedad en condiciones de oscuridad, para asegurar la penetración de los colorantes a las capas más internas de los AMFM y asegurar que no se secaban las muestras ni se fotoactivaban los colorantes antes de tiempo. Posteriormente, cada AMFM fue analizado mediante CLSM usando un objetivo de 10x, capturando la información de cada microfotografía por triplicado, una toma por cada canal analizado según la emisión de cada colorante, (442 nm para Con A-350, 518 nm para FITC y >590 nm para Nile Red).

Con la información proporcionada por CLSM es posible una semicuantificación de los diferentes componentes del fouling lácteo y de los residuos dejados por la limpieza química o enzimática, mediante el uso de software de análisis de imagen Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Para asegurar la selectividad de la Con A-350 para la lactosa caramelizada y determinar la afectación de los problemas de autofluorescencia que presentaban las muestras, se creó un control de caramelo puro de lactosa sobre discos de acero inoxidable. Para ello se preparó una solución de 15 g de lactosa monohidrato (Sigma, Madrid, España) y 50 ml de agua desionizada. Esta solución fue sometida a un tratamiento térmico, hasta su ebullición, en constante agitación. En el momento en que la solución se volvió ligeramente parda, se retiró de la fuente de calor y se dispensaron gotas de caramelo sobre las superficies metálicas atemperadas. Primero a temperatura ambiente y después a 4°C durante 24 h, para obtener una muestra lo más sólida posible.

Las gotas de caramelo de lactosa se tiñeron con 80 µl de preparado de bicarbonato de sodio (60 µl), más ConA-350 (20 µl) (Tabla 4), como se indicó anteriormente, para los AMFM (15 h en humedad y oscuridad). Más tarde se analizaron, mediante DEM y CLSM, para observar las diferencias de señal entre las gotas de caramelo teñidas y las gotas de caramelo sin teñir y poder discernir entre la fluorescencia de fondo y la del colorante diferencial.

Este método de control de la señal recibida, también se comprobó con caramelos preparados con soluciones de sacarosa (15 g en 50 ml de agua) (BD, Madrid, España) y de almidón (15 g en 50 ml de agua) (Panreac, Castellar del Vallès, España).

1.10. Estudio de la fracción inorgánica del fouling lácteo.

1.10.1. Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDX) en AMFM.

Durante la observación del fouling lácteo sobre las superficies metálicas mediante SEM, se usó el EDX INCAx-act (Oxford Instruments plc, Tubney Woods, Reino Unido), acoplado al microscopio, para poder hacer un análisis elemental de los componentes de los depósitos dejados por la leche.

Los principios de funcionamiento del EDX se basan en la proyección de un haz de rayos X contra una muestra. Con la incidencia del haz contra la muestra, se pueden excitar electrones de los átomos. Esos electrones excitados saltan de la capa de electrones de cada átomo y su lugar será ocupado por un electrón de una capa de electrones de mayor energía. Durante ese proceso, esa diferencia de energía será emitida en forma de rayos X.

Esos rayos X se pueden medir mediante el uso de un espectrómetro de energía dispersiva, como los rayos X emitidos. Dado que la diferencia entre cada capa de electrones y los rayos X, surgidos de esa diferencia, es una característica propia de los átomos de cada elemento, mediante el análisis de los rayos X, se puede determinar la composición elemental de la muestra.

1.10.2. **Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) de AMFM y residuos de limpieza.**

Todos los lotes de leche cruda usados para hacer fouling lácteo fueron sujetos a una digestión ácida con HNO_3 (Panreac, Castellar del Vallès, España) en un digestor por microondas Ultrawave (Milestone Inc, Shelton, CT, USA).

Se procesaron tres lotes de cada una de las muestras sólidas, modelos de fouling sin modificaciones, modelos limpiados con el producto alcalino y de los modelos limpiados con solución enzimática. Para cada muestra el modelo fue hervido en ácido nítrico durante 30 min. Después se filtraron las muestras con un filtro de 0.45 μm de diámetro de poro y se enrasó la muestra filtrada hasta el volumen necesario para el análisis con agua mili-Q.

Una vez que las muestras fueron sometidas a digestión ácida, se inyectaron en el ICP-OES Optima 4300DV (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA), para cuantificar los minerales de la muestra de fouling lácteo. Se usaron los picos más representativos de la espectrometría producida por el análisis elemental, mediante EDX, para seleccionar los minerales a cuantificar con la técnica de ICP-OES. Se analizaron los elementos: calcio (Ca), potasio (K), sodio (Na), magnesio (Mg) y fósforo (P).

El sistema de ICP-OES funciona en dos etapas, la primera, el ICP trabaja mediante la nebulización de la muestra líquida en una llama de argón en estado plasma. Las moléculas de la muestra chocan contra los iones del plasma, descomponiéndose en los átomos que conformaban la muestra, perdiendo electrones. Durante este proceso se emiten radiaciones características para

cada elemento de la tabla periódica. En ese instante el sistema OES entra en funcionamiento y captará la radiación en forma de luz emitida, por la descomposición de la muestra en medio del plasma y separándola en distintas longitudes de onda. Cada longitud de onda será captada por un fotodetector, que medirá la intensidad de luz en esa longitud. Mediante la comparación de cada valor con estándares propios, se puede obtener la concentración de los minerales en la muestra.

1.11. Organización de los análisis de los AMFM.

Del total de modelos producidos, se separaron en varios lotes para cada análisis. Para las limpiezas químicas y enzimáticas se utilizaron 40 AMFM. De los 40 modelos para limpiar, 10 se dedicaron a cada tipo de limpieza (20 en total) para ser analizados mediante microscopía con colorantes fluorescentes. Además, se analizaron mediante CLSM 10 modelos de fouling sin limpiar, para tener datos del fouling antes de los tratamientos de limpieza y poder compararlos con los restos que quedaron sobre la superficie metálica, después del tratamiento de limpieza. Mediante CLSM se pudo conseguir datos sobre la fracción orgánica del fouling adherido a las superficies de acero inoxidable 316 2B.

Para la determinación inicial de los elementos minerales de los modelos AMFM, primero se analizaron mediante SEM, 2 modelos de fouling.

Posteriormente, el restante del lote de AMFM limpiados con distintas técnicas, se analizó mediante la técnica ICP-OES. Se destinaron 10 AMFM de cada una de las distintas limpiezas más un lote extra de 10 AMFM sin alterar para el análisis elemental ICP-OES, más una alícuota de cada uno de los lotes de leche cruda de vaca usada para la producción del modelo.

Todos los demás modelos se usaron para otras metodologías (DEM, confocal óptico, etc) o para la optimización del procesado y limpieza de los AMFM antes de ser analizados.

1.12. Procesado estadístico de los datos.

Todos los datos obtenidos en este estudio fueron procesados usando Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA) y el paquete estadístico IBM SPSS 23 (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

Los resultados fueron analizados según una prueba One-way ANOVA con un contraste *a posteriori* de Tukey y el T-test con la prueba de Welch. El número de muestras varía entre los distintos experimentos, pero típicamente es $n=10$. El nivel de significación para todas las pruebas estadísticas fue de $p \leq 0.05$.

2. Resultados y discusión.

Los resultados de estos experimentos se separaron en tres secciones diferenciadas:

- Mejora de la acción de las enzimas,
- Resultados de los distintos métodos de análisis de los modelos de laboratorio,
- Resultados de las limpiezas de los modelos de fouling lácteo.

2.1. Resultado de los tampones probados.

Los resultados del empleo de los distintos tampones mostraron mantener estable el pH a lo largo del tiempo y de compensar las variaciones de temperatura. Para simular posibles diluciones, durante el paso de producto por tuberías, los diferentes tampones se diluyeron en agua de red. Los resultados obtenidos indican una gran estabilidad, ideal para procesos de limpieza donde puede haber variaciones ambientales importantes.

En los datos representados en la Figura 19, las curvas de evolución del pH, se aprecia que las pendientes son planas, indicando la poca variación que tienen los tampones a distintas temperaturas (entre 20 y 55°C) y tiempos (hasta 2,5 h) desde su producción. En cuanto a la curva control se ven diferencias de pH en relación a los cambios ambientales.

pH a distintas temperaturas y tiempos

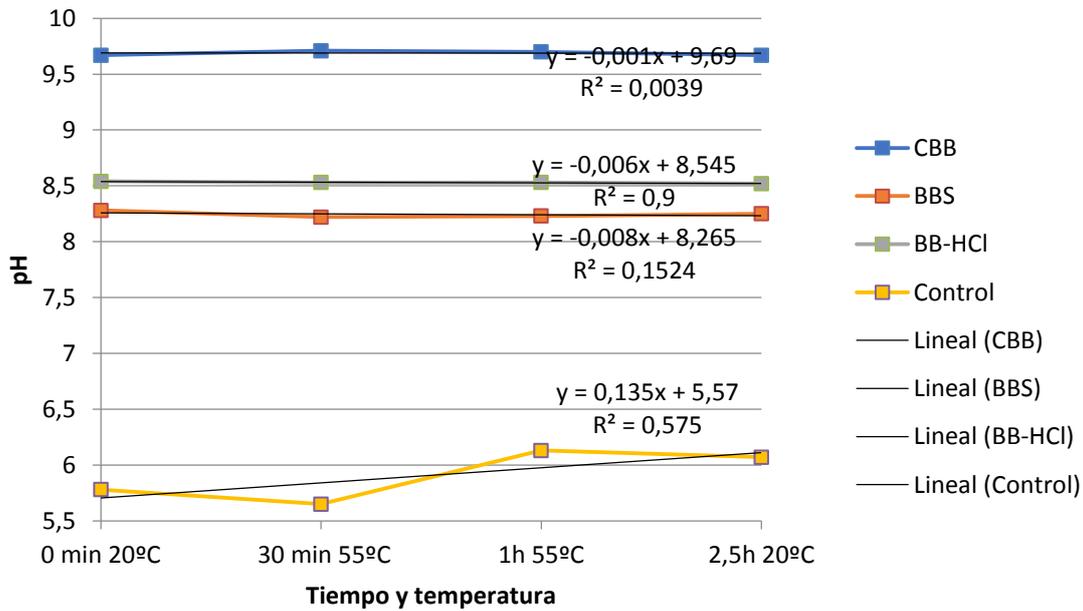


Figura 19: Medición del pH de las tres soluciones tamponadoras y de un control delo largo del tiempo a temperatura variable. Todos los datos por triplicado.

Respecto a la medición de pH a distintas concentraciones del tampón, se vio una gran estabilidad para algunas de las mezclas estudiadas, mientras otras perdían su habilidad para estabilizarlo (Figura 20). El tampón CBB sufrió una caída del pH, cuando la concentración disminuía más de un 25% (1/4), respecto a la recomendada por el fabricante. Esto implica que podría ser un producto interesante si se buscaran distintos entornos de pH con un solo tampón. Se podría emplear cuando se mezclan dos tipos de enzimas, con óptimos de eficacia diferentes para cada uno de ellos. Sin embargo, para nuestro estudio, no parece suficientemente estable como para ser aplicable en el entorno dinámico de la limpieza de fouling mediante los enzimas seleccionados en nuestro estudio.

Los resultados para los tampones con boro fueron mucho mejores, siendo el tampón BBS una buena solución para el mantenimiento del pH entre 8,5 y 8

durante todas las diluciones. El tampón BB-HCl a su vez, mantuvo el pH estable con una variación de $\pm 0,15$ a lo largo de las diluciones sucesivas.

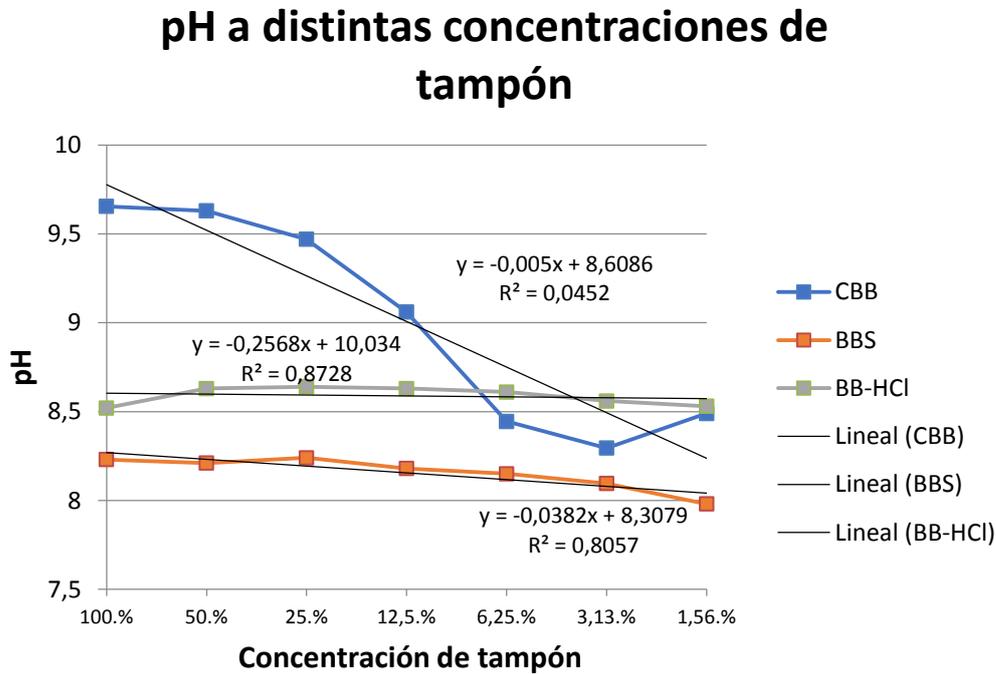


Figura 20. Medición del pH de distintas soluciones tamponadoras usando agua de red, a 20°C. Todos los datos por triplicado.

A partir de todos estos datos, se eligió la solución tamponadora basada en borato-ácido clorhídrico (BB-HCl), como la mejor opción para estabilizar la reacción catalítica de las enzimas usadas para la limpieza de los modelos de fouling lácteo. Por ello, la evaluación del proceso de limpieza enzimática se realizó mediante la inclusión de tampón borato-ácido clorhídrico en agua desionizada. Posteriores controles indicaron, que las soluciones se mantenían siempre estables a pH 8,5, después de efectuar las limpiezas enzimáticas de los AMFM.

2.2. Resultados iniciales del fouling lácteo.

Se usaron diez lotes distintos de leche cruda para la producción de AMFM, produciéndose 200 AMFM, para obtener una variedad de resultados, suficientemente amplia, para poder representar todos los posibles fouling distintos. Las características de los lotes de leche tienen un gran efecto sobre la cantidad de materia adherida.

Los componentes de los 10 lotes de leche cruda usados en los experimentos se analizaron, por triplicado, usando la tecnología de NIRS (Tabla 6). Usando como referencia bibliográfica la Tabla 1 (Bylund, 1995), se puede observar un gran parecido en los contenidos de grasa, proteína y sólidos totales entre la referencia bibliográfica y la leche usada para la producción de modelos de fouling lácteo. En el caso de la lactosa, Bylund (1995) publicó un análisis concreto para este compuesto, mientras que nosotros extrajimos el valor, en base a la diferencia de los demás elementos, respecto a los sólidos totales.

Por ello, se puede asumir que los experimentos realizados con leche cruda de vaca, para producir fouling lácteo y posteriores análisis o limpiezas, serían una simulación correcta a una situación real de fouling en la industria, dado que la leche contenía una composición estándar.

Tabla 6: Composición media de toda la leche cruda de vaca usada para generar fouling lácteo. (n=10, triplicados).

Componentes	Media %
Lípidos	3,63 ± 0,14
Proteínas	3,38 ± 0,10
Sólidos totales	12,64 ± 0,19
Azúcares totales	5,63 ± 0,19

De los 10 lotes de leche cruda usadas durante la producción de fouling, la cantidad de fouling lácteo adherido a las superficies metálicas, aunque no fue idéntica a la concentración de depósito seco por área del modelo de fouling lácteo (MFM) anteriormente producido, se consiguió una cantidad suficiente para trabajar, siendo en todo caso mayor que la producida por otros métodos ya descritos en la bibliografía (Foster y cols., 1988; Barish y Goddard, 2013). Se obtuvo (Tabla 7) 44,56 mg/cm² en el AMFM en comparación con los 52 mg/cm² del MFM (Tabla 3). Sin embargo, con 3 h menos de tiempo para producir los modelos, debido a la adaptación del protocolo de producción de MFM a AMFM.

Tabla 7: Medias del peso acumulado en la producción de AMFM a 5 horas de producción (en gramos) (n=125. Superficies de 3.14 cm²).

Ciclo	Tiempo (horas)	Fouling total (g)	mg/cm ²
0	0	0	0
10	5	0,14 ± 0,065	44,56

2.3. Resultados del análisis morfológico y topográfico de los AMFM.

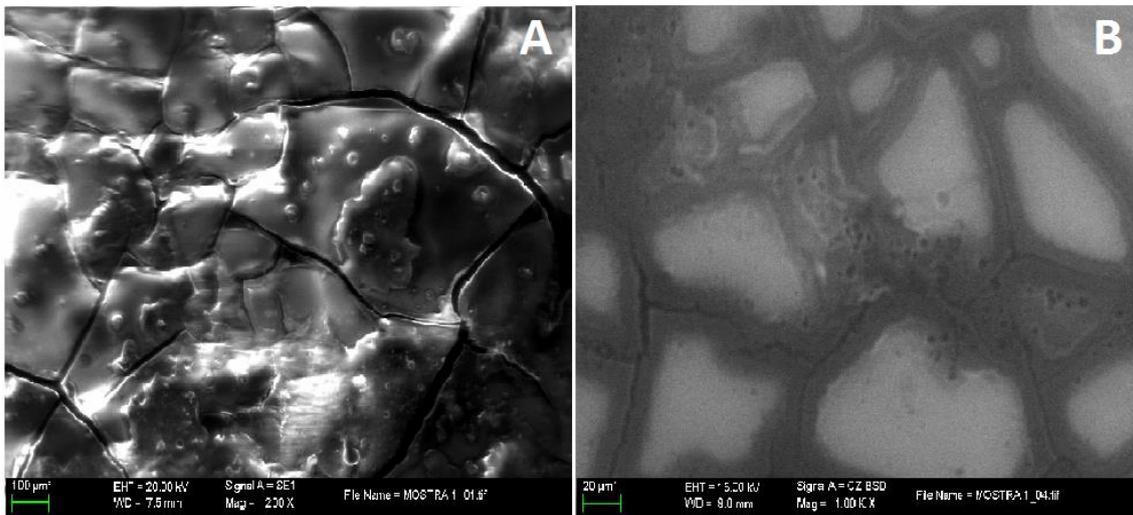


Figura 21. Microfotografía de la morfología de la superficie del fouling adherido a la superficie metálica. Magnificación a 220x (A) y a 1000x (B).

La morfología del fouling lácteo, sobre las superficies de acero inoxidable, usando microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 21), mostró dos tipos distintos de materia adherida. Basado en la densidad que muestran los materiales, en la interacción con los electrones del SEM, se observaron áreas oscuras (Figura 21B), que se podrían explicar por la presencia de altas concentraciones de minerales, con una densidad superior a la materia orgánica.

En la superficie se aprecian fisuras y poros (Figura 21 A, B). Las fisuras se podrían dar por artefactos (alteraciones de origen humano) durante el proceso de secado o durante la estancia en la columna de vacío del SEM. Pero los poros parecen ser propios del proceso de producción de fouling lácteo, quizás relacionados con la presencia de pequeñas gotas de líquido claro (supuestamente grasa de la leche), durante los ciclos de secado en la producción de fouling lácteo. La estructura del fouling en este modelo se parece al obtenido en el modelo de Boyce y cols., (2010) y Foster y cols., (1989), donde

se apreciaban rugosidades y grietas sobre el acero inoxidable. Muy distinto a las microfotografías de los modelos obtenidas por Foster y Green, (1990) o Hagster y cols., (2016), dado que son de fouling tipo B, con un contenido mineral mucho mayor al del tipo A.

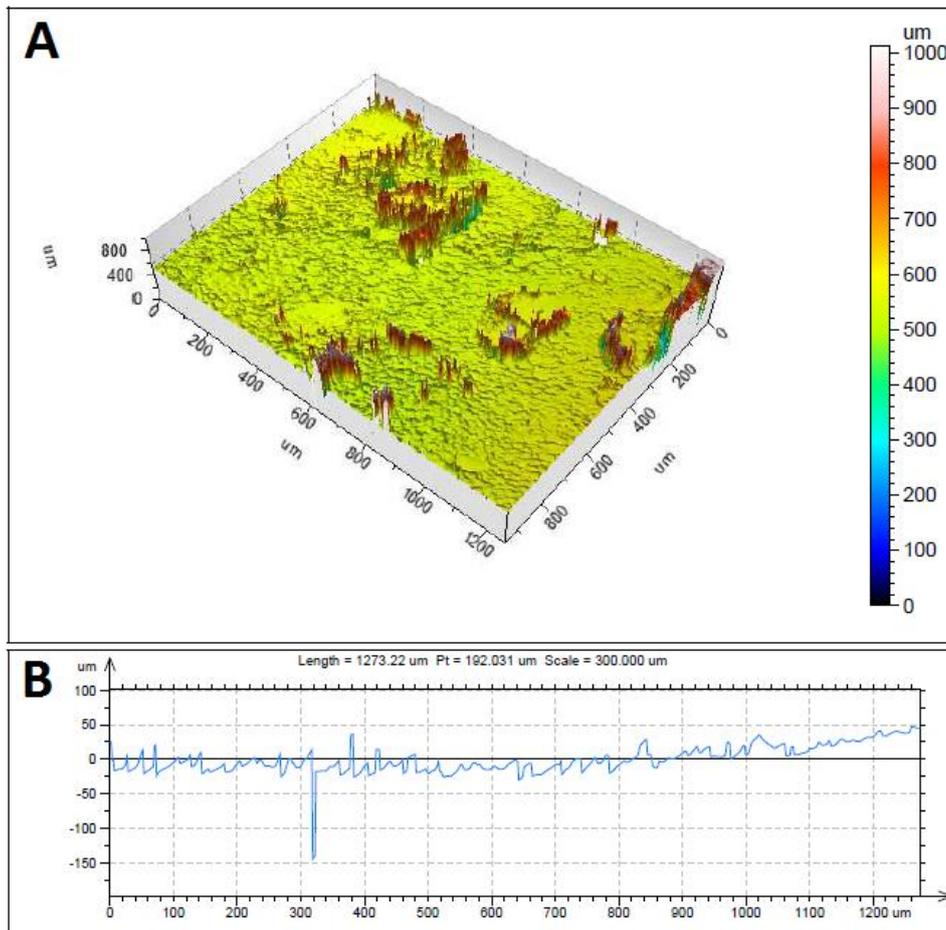


Figura 22. Vista topografía mediante microscopía confocal óptica de los AMFM. A) Vista 3D de la superficie del fouling lácteo. Los colores cálidos representan los elementos por encima de la media de la superficie. B) Perfil topográfico de los AMFM, resumen de toda la información de altura a lo largo del área analizada. El valor 0 en altura representa la altura media de la superficie del fouling.

El análisis con microscopía confocal óptica del fouling lácteo, usando un modelo topográfico en 3D (Figura 22), mostró que las superficies del fouling presentaban rugosidades en regiones concretas, con elevaciones y depresiones. En estas rugosidades podrían penetrar los productos de limpieza directamente,

a la base del residuo de la leche, consiguiendo una mayor eficacia en comparación a si no hubiera acceso fácil al interior de la matriz del fouling. Esto permitiría el acceso de las enzimas, para debilitar los componentes adherentes del fouling a la superficie de acero, logrando despegar una mayor cantidad de residuo con un menor trabajo.

2.4. Resultados de la fracción inorgánica.

La fracción inorgánica del fouling, estudiada mediante espectrofotometría EDX (Figura 23), mostró los elementos presentes en los AMFM. El análisis permitió observar una división en tres zonas diferenciadas. La primera zona, a la izquierda de la figura, con la presencia de carbono (C) y oxígeno (O), representa la materia orgánica de la muestra. La zona central del gráfico representa la fracción inorgánica del AMFM, con picos de sodio (Na), magnesio (Mg), fósforo (P), cloro (Cl), potasio (K) y calcio (Ca). El azufre (S), aunque en la zona media de la gráfica, seguramente tiene su origen en las proteínas de la leche. La zona final de la gráfica, la de mayor energía emitida durante la excitación de los rayos X del EDX, representa al cromo (Cr) y hierro (Fe) componentes de la base del AMFM, el acero inoxidable 316.

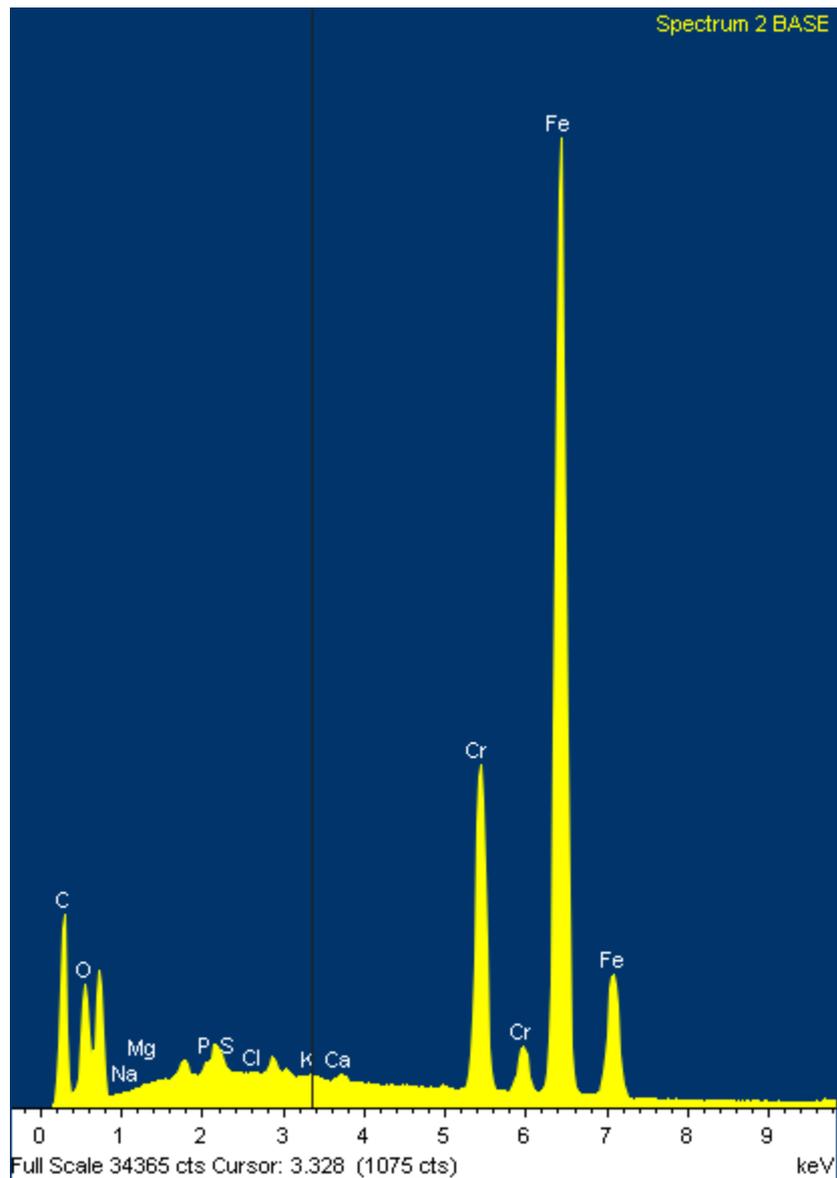


Figura 23. Gráfico espectroscópico del EDX-SEM. Escala expresada en kilo-electrón Volts (keV) de la energía emitida durante la excitación mediante rayos X.

La problemática del análisis, mediante esta técnica, reside en que no se puede cuantificar un elemento de la muestra, si no tiene una concentración mayor al 4%. En nuestras muestras de fouling lácteo, sólo se pudieron cuantificar C, O, Cr y Fe, pero los elementos objetivos del fouling (los elementos de la fracción mineral), no

podieron ser cuantificados, al igual que Hagsten y cols., (2016). Se optó, por tanto, por identificarlos por otros análisis como ICP-OES. Esta técnica es más compleja y cara, pero permite identificar y cuantificar elementos metálicos con gran precisión.

Tabla 8: Resultados de la fracción inorgánica usando ICP-OES de la leche cruda de vaca, de los modelos de laboratorio de fouling (AMFM) y de los restos de la limpieza química y enzimática, valores en mg/g (n=10 para cada tipo de muestra).

Leche cruda				
Ca	P	K	Na	Mg
1,18 ± 0,03	0,87 ± 0,03	1,54 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,11 ± 0
Fouling lácteo				
14,83 ± 3,38	9,79 ± 1,88	7,39 ± 2,23	1,76 ± 0,49	1,07 ± 0,24
Restos de limpieza química				
3,36 ± 10,64	2,44 ± 7,70	<0,05 ± 0	6,04 ± 19,10	0,23 ± 0,74
Restos limpieza enzimática				
4,21 ± 4,88	2,48 ± 2,84	<0,05 ± 0	1,07 ± 1,27	0,20 ± 0,27

Los resultados del análisis de la fracción inorgánica (Tabla 8), sobre leche cruda, mostraron que el elemento con la concentración más alta fue el K (1.54 mg/g), seguido del Ca (1.18 mg/g) y del P (0.87 mg/g). Sin embargo, los mayores valores, en el caso del fouling lácteo, fueron el Ca (14.83 mg/g), seguido de P (9.79 mg/g) y K (7.39 mg/g). Hay que destacar que la acumulación de Ca, en el fouling, fue de 12 veces superior al valor de la leche cruda. Estos resultados corroboran la observación descrita por Bansal y Chen (2006), sobre el incremento de la fracción mineral en el fouling lácteo.

Cuando se llevó a cabo una limpieza química alcalina de los AMFM, se redujo el Ca en un 77,34%, una reducción similar a la apreciada para el P en el fouling lácteo, con un 75,08% menos de contenido. El K es solubilizado completamente pero el Na aumenta un 340,34%. El Na se incrementa debido a la solubilización

del ion, proveniente del producto de limpieza contra el fouling. Este dato puede servir como indicador de final del proceso de limpieza alcalina o como indicativo de una insuficiente etapa de enjuague en la limpieza CIP.

Sin embargo, después de la limpieza enzimática, la reducción en la concentración de Ca y P representa un 71,61% y un 74,67% respecto al fouling intacto. Por lo que la limpieza enzimática, sin la acumulación de Na de la limpieza química, deja una cantidad de mineral 1,5 veces menor que la limpieza química. Es importante señalar, que la cantidad de calcio y fósforo residuales, es mucho más variable después de la limpieza química, que después de la limpieza enzimática. Esto es relevante, porque la homogeneidad del residuo permite la programación de acciones de limpieza complementarias y espaciar los procesos de limpieza.

El uso de un tratamiento ácido, después de uno alcalino o enzimático, parece ser una buena estrategia para desincrustar los minerales mediante solubilización, donde la fracción mineral predominaba en la zona basal del fouling con el acero (Hasegtal y cols., 2016). Este tratamiento complementario tendrá que ser más frecuente en la limpieza química, dada la gran variabilidad en la acumulación de calcio y fósforo, que constituyen lo que se considera la “piedra de la leche”. En el caso de la limpieza enzimática, si tenemos un menor residuo orgánico y un residuo mineral más homogéneo, se podrán espaciar más, con la consiguiente reducción del consumo de agua y energía. Por todo ello, parece que la estrategia enzimática puede ser un buen método, al tener un componente importante contra el material adhesivo (caramelo), lo que hará, a la fracción mineral, más sensible al tratamiento.

2.5. Resultados de la fracción orgánica mediante microscopía fluorescente.

Las pruebas iniciales sobre la composición del fouling lácteo se hicieron usando microscopía DEM (Figura 24, 25), obteniendo microfotografías, tanto por el método de luz reflejada o microscopía óptica, y a la vez por fluorescencia con colorantes selectivos fluorescentes.

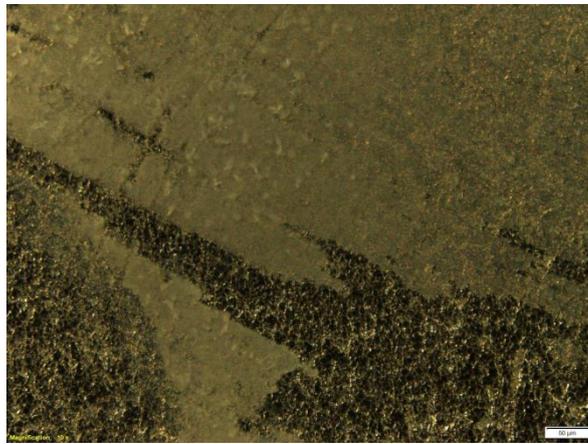


Figura 24. Microfotografía de la superficie del modelo de fouling lácteo por microscopía óptica. Magnificación 20X.

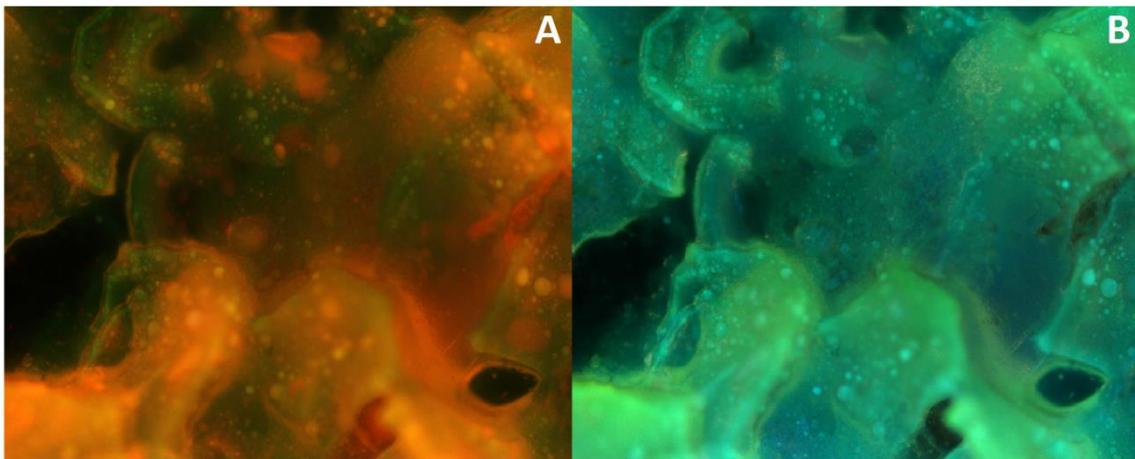


Figura 25. Microfotografía de la superficie del modelo de fouling lácteo mediante microscopía DEM. A) Suma de los canales verde (proteínas) y rojo (lípidos). B) Suma de los canales verde (proteínas), azul (azúcares). Magnificación 40x.

Para profundizar en el estudio de los componentes sólidos del fouling lácteo y de los restos producidos por los dos tipos de limpieza del experimento, se usó microscopía CLSM y colorantes selectivos fluorescentes.

Debido a la autofluorescencia de la muestra, producida por los compuestos de Mallard, debido a la alta temperatura del proceso, en presencia de proteínas y azúcares (Morales y cols., 1995), no es recomendable usar DEM para semicuantificar. Es difícil distinguir e identificar los compuestos del fouling, dado que solo se puede identificar la superficie. Para poder ver el interior del fouling, se requería modificar la muestra con cortes artificiales o visualizando las grietas producidas durante el secado o los poros dejados por la grasa.

Por eso, con el uso de los colorantes selectivos (Tabla 5) y CLSM, se pudieron recoger grupos de microfotografías a distinta profundidad, para *a posteriori*, juntarlas todas en un modelo 3D, mediante software especializado en análisis de imagen. De esta forma se pudo obtener una representación de los componentes orgánicos del fouling lácteo en 3D.

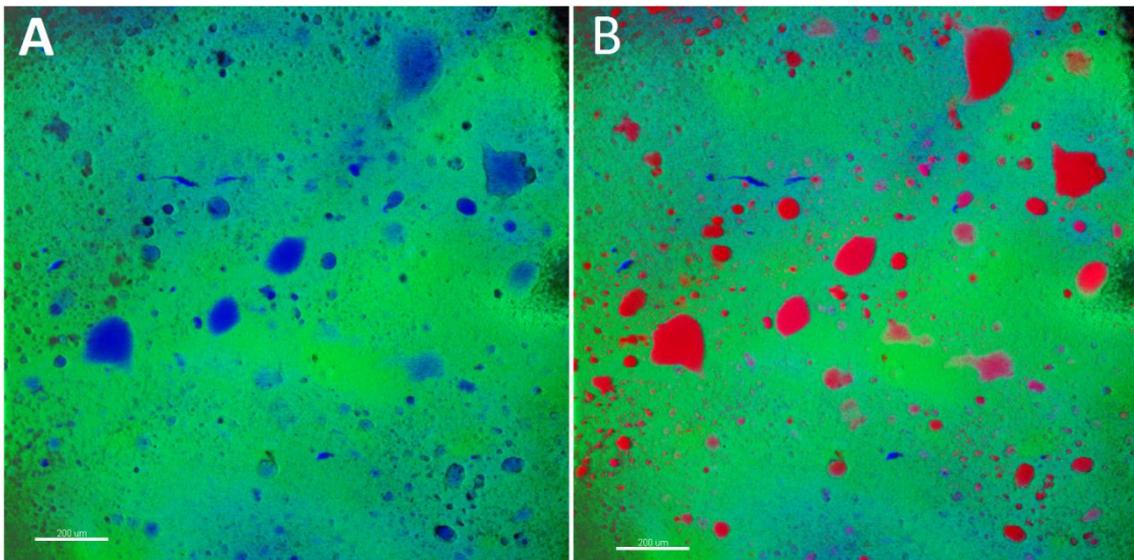


Figura 26. Microfotografía de la superficie del modelo de fouling lácteo. A) Suma de los canales verde (proteínas) y azul (azúcares). B) Suma de los canales verde (proteínas), rojo (lípidos) y azul (azúcares). Magnificación 10x.

Gracias a la definición y precisión obtenida mediante el uso de CLSM, se pueden obtener imágenes (Figura 26)], en las que se observan simultáneamente distintos colorantes y, por tanto, los componentes para los que son más afines. En la primera microfotografía se puede observar (Figura 26A) que la acumulación de proteínas se encuentra superpuesta a la de azúcares, viéndose estos últimos, sólo en ciertas regiones de la muestra, como también describieron en Boyce y cols., (2010). Como ya se había visto anteriormente en otros trabajos (Hasegtal y cols., 2016), las proteínas tienden a localizarse mayoritariamente en la superficie.

Si juntamos todos los canales empleados en este experimento (Figura 26B), se puede observar que muchas de las zonas donde se veía el azúcar en azul, ahora están marcadas en rojo (lípidos), dando una idea aproximada de la composición espacial, en el modelo de laboratorio.

Toda esta información indica que las proteínas se acumulan en la superficie, acompañada de pequeñas porciones de lípidos. En capas inferiores se encuentra la mayor parte del azúcar, que en este caso pensamos que estará caramelizado.

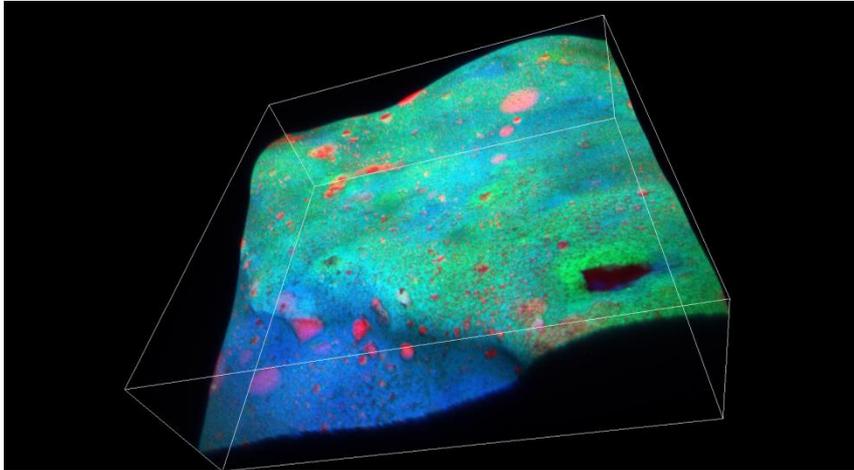


Figura 27. Representación 3D de un grupo de microfotografías de un AMFM, con 3 μm de diferencia en el plano Z entre tomas. Suma de canales verde (proteínas), rojo (lípidos) y azul (azúcares).

En una de las representaciones obtenidas mediante CLSM (Figura 27), se puede observar lo que ya se apreciaba en las microfotografías 2D. Es decir, una predominancia de la señal verde en superficie, junto a bolsas de señal roja, que también se encuentran aisladas en zonas profundas de la muestra analizada. Por el contrario, se puso de manifiesto una predominancia de la señal azul en las capas bajas de la muestra, con pequeñas cantidades de verde. No se pudo llegar a la interfase metal-fouling por el grosor de la muestra, pero ya se intuye una tendencia que respalde las suposiciones del caramelo como elemento cohesionador del total del fouling.

Abundancia de los componentes

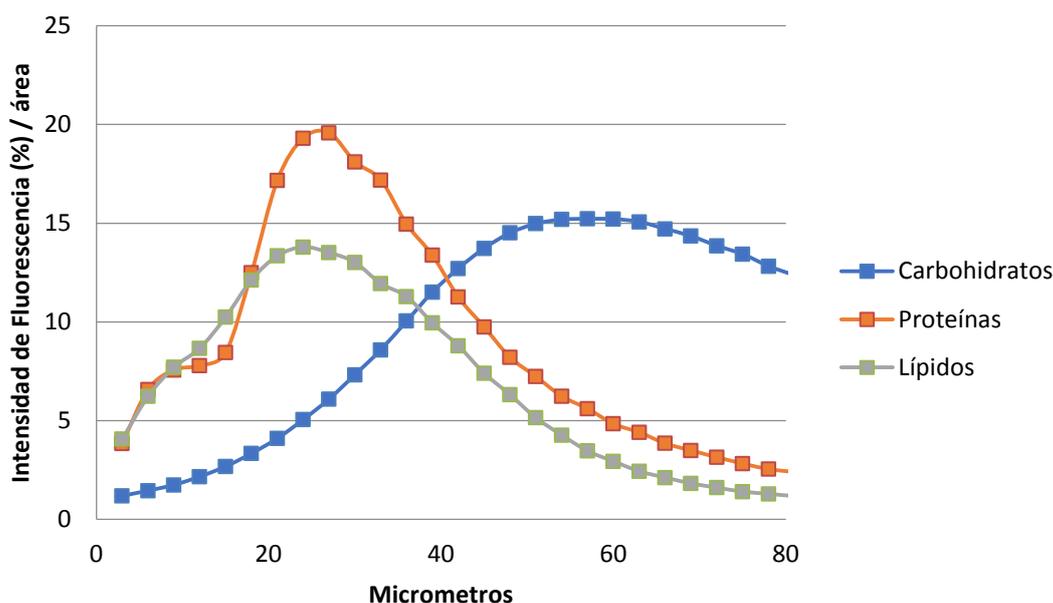


Figura 28. Representación gráfica de la abundancia de los componentes según su intensidad de fluorescencia a lo largo de la profundidad de una muestra por CLSM.

Usando el programa Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), fue posible extraer la información bruta de la señal captada por el fotodetector del CLSM. Obteniendo esa información, para cada canal por separado, se pudieron obtener los valores de la intensidad de fluorescencia, expresados en porcentajes de intensidad relativa, para cada colorante, de cada microfotografía, de toda una secuencia de microfotografías, de una misma muestra.

Con los datos de toda una batería de microfotografías de una misma área analizada, a distintas profundidades, se puede saber de forma gráfica (Figura 28), en qué profundidad de la muestra se encuentra mayor intensidad para un canal. En su conjunto se obtiene una gráfica, que muestra que como ya se veía en las imágenes por CLSM, cerca de la superficie se encuentran grandes depósitos de materia coloreada en rojo y verde (lípidos y proteínas) y que por

debajo de esos depósitos se encuentra el reservorio principal de materia teñida por la Con A-350, el azúcar presuntamente responsable de formar caramelo.

Si se superponen todas las microfotografías de una sección, en un solo archivo, con toda la información bruta de la muestra en una sola microfotografía (mediante un programa de análisis de imagen tipo Metamorph), con la información de cada colorante por separado, se puede llegar a realizar una semicuantificación del contenido (Tabla 9) de cada componente del fouling lácteo.

La cuantificación completa no es posible, dada la variabilidad relativamente elevada de la matriz de estudio (Waters, 2009), obteniendo resultados dispares entre las repeticiones de un mismo grupo de muestras. A pesar de no tener valores absolutos, son una ayuda para identificar los componentes mayoritarios de las muestras y, con ese conocimiento, poder mejorar la limpieza de este tipo de residuos.

Tabla 9: Media del contenido de cada componente marcado según la intensidad de fluorescencia en porcentaje (%) en distintas muestras de fouling lácteo (n=10 para cada tipo de muestra).

<u>Muestra</u>	<u>Lípidos</u>	<u>Proteínas</u>	<u>Azúcares</u>
AMFM	<u>9,33 ± 1,48</u>	<u>39,39 ± 6,43</u>	<u>51,29 ± 6,32</u>
Post-limpieza química	<u>54,65 ± 1,03</u>	<u>27,91 ± 0,89</u>	<u>17,43 ± 0,66</u>
Post-limpieza enzimática	<u>10,04 ± 2,81</u>	<u>38,82 ± 8,08</u>	<u>51,14 ± 8,38</u>

Los resultados de lípidos, proteínas y azúcares (Tabla 9) muestran que, uno de los grandes componentes de los modelos de laboratorio, correspondería al caramelo, seguido de las proteínas, siendo las grasas la fracción más minoritaria

del conjunto. En el caso del uso de enzimas, parece que las proporciones de cada elemento en la fracción orgánica se mantienen relativamente idénticas a las encontradas en el AMFM. Mientras que, en el caso del uso de un producto alcalino, se giran todas las proporciones, dando en mayor número las grasas, igualando, en gran medida, los otros dos grupos de componentes (proteínas y azúcares).

2.6. Resultados de la limpieza de los modelos de laboratorio de fouling adaptado.

Con los programas Excel y SPSS descritos anteriormente, se gestionaron los datos generados en los procedimientos realizados en esta sección. Por ello, se determinó la eficacia de los distintos tipos de tratamientos de limpieza, empleando el modelo de laboratorio de fouling adaptado (AMFM) (Tabla 10).

Tabla 10. Eficacia de la eliminación de fouling de los AMFM con dos productos de limpieza distintos.

Producto de limpieza	Eficacia en la reducción del fouling lácteo (%)	Numero de muestras (n)
Producto químico alcalino	81,93	16
Producto enzimático mejorado	82,30	17

No se pudieron observar diferencias estadísticamente significativas en el ámbito de la eficacia eliminando fouling lácteo de los modelos AMFM, pero ambos resultados son muy positivos. Las ventajas del método enzimático, frente al químico, radicarían en otros ámbitos como los ahorros de agua y energía o la reducción de desechos que requieran tratamientos de neutralización para su eliminación (Boyce y cols., 2010; Fryer y Asteriadou, 2009; Graßhoff, 2002; Lequette y cols., 2010 Takahashi y cols., 1996).

VI: Pruebas de limpieza en situación real, comparativa en planta piloto entre el tratamiento químico clásico y un tratamiento enzimático de propia creación

1. Material y métodos.

1.1. Fuente del fouling lácteo.

Para escalar los resultados previos, a planta piloto, fueron necesarios 600 L de leche cruda de vaca (en recirculación) por tratamiento de pasteurización y 200 L para atomizador, obtenida de granjas cercanas a la planta piloto de Laboratorios Ordesa-IRTA en Monells (Girona, España). Los estudios de pasteurización se realizaron por duplicado, en total se gastaron 4000 L totales, 3.600 L para pasteurizador y 400 L para atomizador.

1.2. Intercambiador de calor en placa (PTH) de la planta piloto.

La pasteurización es un proceso térmico que reduce la carga microbiana de un producto alimentario. Este proceso tiene como objetivo destruir los patógenos clásicos, presentes en la materia prima y, en general, reducir la carga microbiana termosensible total. Por tanto, se consigue alargar la vida comercial de un alimento, sin presentar merma en las propiedades organolépticas, ni suponer un riesgo para la salud. En este proceso se controla, de forma precisa, la temperatura y el tiempo del tratamiento al que se somete la leche, para conseguir la eliminación de los microorganismos presentes (Madigan y cols., 2012).

Independientemente del tratamiento usado para rebajar la carga microbiana, la maquinaria más usada, para tal fin, es un intercambiador de calor. Este consiste en dos circuitos paralelos, que contactan entre sí, pero no comunicados. Por uno de los circuitos fluirá un líquido frío (en nuestro caso la leche) y por el otro se bombeará uno caliente (normalmente agua o vapor). Al estar las dos

canalizaciones en contacto directo, se producirá una transmisión de calor de la tubería caliente al líquido frío a través de las superficies de las conducciones. Por ello, es sobre la superficie de las conducciones de la leche, dentro de la maquinaria de producción, donde se acumulará el fouling lácteo.

Durante los experimentos se trataron térmicamente lotes de leche de vaca cruda, para garantizar el ensuciado de las conducciones de leche del equipo, consiguiendo la formación de fouling lácteo en condiciones reales de trabajo. Se realizó una pasteurización usando un Intercambiador de calor en placa (PTH). Los tratamientos se realizaron en las instalaciones de Laboratorios Ordesa-IRTA en Monells (Girona, España).

El proceso de pasteurización de la leche cruda se programó para trabajar a 110°C durante 2 h, a un ritmo de 600 L/h. Este procedimiento se realizó por duplicado, dando un volumen procesado de 1.200 L por lote.

1.3. Limpieza del fouling lácteo del PTH.

Se hicieron dos tipos de limpieza del fouling lácteo en la instalación. La primera por el método tradicional de doble etapa, con productos alcalinos y ácidos. La segunda limpieza se realizó con la fórmula enzimática desarrollada por nosotros durante las anteriores etapas del proyecto. La formulación industrial de trabajo fue producida por la empresa ITRAM Higiene (Vic, España), como socio industrial del proyecto Enthalpy. Su desarrollo consistió en una adaptación del medio tamponador de laboratorio, para su uso industrial, de acuerdo con las normas de contacto y uso alimentarios. Los enzimas y su concentración fueron los formulados en los experimentos anteriores.

1.3.1. Limpieza alcalina del PTH.

Después del tratamiento térmico de la leche se empezó con el proceso de limpieza de la maquinaria. Para ello, se realizó un primer enjuague usando agua de red (Monells, España) a temperatura ambiente (20 min y 200 L de agua en total). Con este proceso se eliminó cualquier suciedad o depósito poco adherido a las superficies. Asimismo, se consigue eliminar cualquier sustancia soluble derivada de la leche o del procesado térmico.

Una vez concluida la etapa de enjuague, se introdujo una solución detergente alcalina (ITRAM Higiene, Vic, España), diluida al 3%, en 200 L de agua de red. Esta solución se la hizo pasar durante 20 min a 80°C, en recirculación. El objetivo de este producto es saponificar las grasas, desnaturalizar las proteínas y forzar la rotura de las estructuras orgánicas que forman el fouling lácteo y disolver, en la medida de lo posible, los residuos adheridos a las superficies.

A continuación, para terminar con la limpieza alcalina, se volvió a realizar un enjuague de la maquinaria, usando agua de red a temperatura ambiente, durante 20 min (200 L en total). Este segundo enjuague es crucial para eliminar cualquier remanente de producto alcalino y para neutralizar el pH. Esta etapa evita cualquier contaminación cruzada del limpiador con futuros tratamientos ácidos o lotes de leche tratada.

1.3.2. Limpieza ácida del PTH.

Después de un tratamiento de leche, se realizó un tratamiento ácido, para desincrustar y solubilizar el fouling. Para ello, se inyectó un detergente ácido al 1% (ITRAM Higiene, Vic, España) en 200 L de agua de red. El tratamiento se realizó a 50°C durante 20 min y en recirculación.

Al igual que al final del tratamiento alcalino, se realizó un enjuague con agua de red a temperatura ambiente, durante 20 min (200 L en total), para eliminar y neutralizar el pH de los restos de producto de limpieza ácida y evitar contaminación cruzada.

1.3.3. Limpieza enzimática del PTH.

Una vez realizada la tercera pasteurización de 1200 L de leche de vaca cruda, se procedió a la limpieza mediante el nuevo formulado enzimático, para posteriormente comparar los resultados de eliminación de fouling lácteo con los obtenidos por el tratamiento químico, empleando productos alcalinos y ácidos. El primer paso consistió en un enjuague, al igual que se realizó en la limpieza química, con agua de red a temperatura ambiente (20 min y 200 L de agua de red), para eliminar todo el material poco adherido y los componentes solubles de la leche.

La fórmula enzimática patentada (Rodríguez-Jerez y cols., 2016 y 2017) fue producida en suficientes cantidades, para la limpieza en la planta piloto, por la empresa ITRAM Higiene (Vic, España). La formulación (Tabla 4) de enzimas y tensoactivos se produjo bajo el nombre de CleanZIP y como ENTHALPY Buffer el medio tamponador adecuado para la formulación enzimática.



Figura 29. Producto enzimático producido por ITRAM Higiene. Fórmula enzimática bajo el nombre comercial CleanZIP y la solución tamponadora, ENTHALPY Buffer, para la limpieza de la planta piloto.

En la planta y, previo a su empleo, se preparó una solución al 1% de CleanZIP y al 3% de ENTHALPY Buffer en 200 L de agua de red, haciéndolo recircular a 50°C durante 20 min. Para finalizar la limpieza, se realizó un segundo enjuague idéntico al realizado al inicio del proceso de limpieza, usando agua de red a temperatura ambiente (20 min y 200 L de agua en total).

1.4. Atomizador (Spray Dryer) en la planta piloto.

La atomización de la leche es el proceso más extendido en la industria alimentaria para desecar líquidos y obtener un producto granulado, de larga duración. Esta tecnología posee la ventaja que solo se requiere diluir en agua para reconstituir el producto original, lo que permite incluir el producto en multitud de alimentos de forma sencilla. En el presente estudio se usó este método para la producción de leche en polvo, para obtener un producto de gran duración y que tiene unos beneficios adicionales como solucionar

problemas de sobreproducción de leche puntuales o para reducir espacios de almacenamiento de grandes lotes.

En la atomización, la leche se dispersa en una lluvia de gotas finas desde la parte superior de un silo, con unos inyectores especiales para controlar el diámetro de gota de forma correcta. A su vez, se inyecta aire a alta temperatura, tanto a favor como en contra de la corriente de caída de las gotas. El aire caliente eliminará gran parte del contenido de agua de las gotas, dejando que precipite en un depósito, en la base del silo el producto desecado. La temperatura del aire suele ser de $>200^{\circ}\text{C}$, pero una vez ha eliminado el agua, se reduce a menos de 100°C para evitar daños en el producto (Pearce, 2014).

Durante este proceso se pueden producir distintos problemas. Entre ellos, que se obstruyan los inyectores por la acumulación de fouling y/o que parte del polvo recalentado se adhiera a las superficies internas del silo. La lactosa puede cristalizarse en agregados de alta higroscopicidad y adherencia, que puede tender al apelmazamiento o "**cacking**" de la lactosa sobre las superficies (Fox y McSweeney, 1998).

En este estudio, para proceder a la producción de leche en polvo en el atomizador, primero se realizó una pasteurización de la leche cruda de vaca, tal y como se detalló anteriormente. A las 2 h de procesado, se atomizó 200 L de leche en las mismas instalaciones de Laboratorios Ordesa-IRTA de Monells. Este proceso se realizó por duplicado, para ser tratado el residuo de las paredes del silo mediante procedimientos químicos y por métodos enzimáticos.

1.5. Limpieza del fouling lácteo del atomizador.

El primer método probado para eliminar este tipo de fouling lácteo, derivado de la producción de leche en polvo, es el uso del tratamiento químico con producto alcalino, seguido de uno ácido. El segundo método empleado para limpiar fue el enzimático, para desincrustar el fouling de las superficies metálicas. En todos los casos, el sistema de limpieza se realizaba mediante un equipo de "Cleaning In Place" (CIP).

1.5.1. Limpieza alcalina del atomizador.

La primera etapa del proceso consistió en un enjuague con agua de red a temperatura ambiente de la maquinaria para eliminar la mayor parte de residuo soluble o poco adherido.

A continuación, se usó un producto espumante alcalino, para aumentar el tiempo de contacto del limpiador con las superficies de la instalación. La solución aplicada consistía en una solución al 3% del detergente espumante alcalino Jet Foam (ITRAM Higiene, Vic, España) en agua de red. El tratamiento se realizó a 80°C durante 20 min. A continuación, se realizó un segundo enjuague durante 20 min con agua de red, para eliminar los restos del producto de limpieza y neutralizar el pH alcalino del tratamiento.

1.5.2. Limpieza ácida del atomizador.

Después del tratamiento alcalino, se siguió con un tratamiento ácido con base espumante, usándose una solución al 1% de Acid Jet (ITRAM Higiene, Vic,

España) de agua de red, aplicado durante 20 min a 50°C, con el fin de desincrustar, sobre todo, los residuos minerales de la leche. Para finalizar el proceso de limpieza química, el equipo se enjuagó con agua de red, durante 20 min, como en el resto de operaciones.

1.5.3. Limpieza enzimática del atomizador.

Para limpiar la instalación después del segundo procesado de leche en el atomizador, se usó un tratamiento enzimático. El primer paso consistió en un enjuague con agua de red, a temperatura ambiente, durante 20 min. A continuación, se aplicó el producto enzimático CleanZIP, ya probado contra el fouling lácteo, pero añadiendo un aditivo espumante al tensoactivo, con la finalidad de producir espuma, lo que aumentará el tiempo de contacto de las enzimas con las superficies a tratar. El producto consistía en una solución al 1% del producto ENTHALPY Foam (ITRAM Higiene, Vic, España) y al 3% de ENTHALPY Buffer, ambos en agua de red, y aplicado durante 20 min a 50°C. Como último paso, para terminar este proceso de limpieza enzimática, se realizó un enjuague con agua de red a temperatura ambiente durante 20 min.

1.6. Análisis de los residuos.

Una vez que se aplicaron las distintas técnicas de limpieza (química y enzimática) sobre distintos tipos de suciedades derivadas del tratamiento de leche (fouling de la pasteurización y de la atomización y secado), se realizaron un conjunto de análisis, descritos a continuación, para determinar cuál de los dos tratamientos es mejor para eliminar el fouling lácteo.

1.6.1. Extracto seco de la solución de limpieza.

De cada etapa de limpieza (enjuague, tratamiento alcalino, tratamiento ácido o tratamiento enzimático) se recogieron muestras del agua inyectada al sistema de pasteurización (100 ml por duplicado) e inmediatamente guardadas en congelación a -18°C.

Para el análisis de residuo en el agua de enjuague o en las soluciones de limpieza, se dejaron atemperar las muestras. A continuación, en unos recipientes metálicos, pesados previamente, se añadieron 20 ml de muestra en cada recipiente. A partir de aquí, se dejaron secar en una estufa de aire forzado a 90°C, hasta la completa desecación de la muestra.

Después de obtener el residuo seco de las muestras de agua de la limpieza, se dejaron atemperar los recipientes y se pesaron, cada uno de ellos, en una balanza analítica. Los cálculos de fouling lácteo eliminado, para cada tipo de limpieza, se calcularon en g/L.

1.6.2. Análisis de la composición del fouling por NIRS.

Una vez terminada la limpieza enzimática del pasteurizador, se abrieron los sellos herméticos entre las placas del PHT para observar el resultado del proceso. Los residuos obtenidos de la limpieza del fouling lácteo, mediante enzimas, fueron analizados de acuerdo a su composición.

Para su estudio se usó microscopía DEM, con colorantes específicos y NIRS, para obtener una aproximación sobre las proporciones de su composición. Además

de una carbonización a 550°C para obtener el peso de la fracción mineral de la muestra.

1.6.3. Fluorescencia del fouling.

Dados los precedentes anteriores, donde se observaba la presencia de elementos autofluorescentes en el fouling lácteo, se propuso el seguimiento del proceso de limpieza mediante la medición de la fluorescencia de los marcadores derivados de la limpieza del fouling.

La técnica consistió en un análisis de fluorescencia a 90° y otro de fluorescencia “front-face” (que permite realizar determinaciones en muestras poco diluidas) con un espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent Technologies, Madrid, Spain) acoplado a una lámpara de xenón y usando un accesorio para analizar la muestra en una geometría a 90° o empleando un ángulo de incidencia de 35° en configuración “front-face”, usando una cubeta Suprasil® quartz cuvettes UV fluorescence cell (Agilent Technologies, Madrid, España).

Las muestras analizadas fueron las aguas de limpieza usadas para el análisis de residuo seco y fouling lácteo derivado de la producción de leche en polvo. Los marcadores elegidos fueron los descritos en el trabajo de Ayala y cols (2017), que se considera que provienen de tratamientos térmicos de la leche y puede que se adapten bien a este residuo que, de hecho, se produce durante los tratamientos térmicos de la leche.

El análisis se realizó con una longitud de onda de excitación de 315 nm y se capturo la emisión entre 350 y 500 nm para el marcador de la ditirosina (Dt).

Para analizar los compuestos de Maillard (MC), la muestra se excitó a una longitud de onda de 330 nm y se leyó la emisión a 350-500 nm. Para detectar la fluorescencia del triptofano (L-Trp), la muestra se excitó a 290 nm, con lectura de emisión entre 300 y 450 nm. Finalmente, se analizó la fluorescencia de la riboflavina (Rbf) con una excitación de 450 nm y una emisión entre 470 y 570 nm. Todos los análisis se realizaron por triplicado, en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la UAB.

1.6.4. Análisis microbiológico.

Para confirmar la efectividad de los procesos de limpieza y para descartar la formación de biofilms y biofouling, en el interior de las instalaciones, se realizó un análisis microbiológico, tanto de la leche cruda, como de las aguas de enjuague y las soluciones de limpieza después de cada proceso.

También se realizaron ensayos de suspensión (UNE-EN 1040), con alguna modificación, para comprobar el efecto bactericida que pudiera tener la fórmula enzimática CleanZIP al utilizarla en la planta piloto. Asimismo, se realizaron ensayos bactericidas sobre acero inoxidable (UNE-EN 13697), para comprobar su efecto en bacterias adheridas a una superficie.

Para el ensayo bactericida mediante la norma UNE EN 1040 se empleó la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6385. La recuperación de la cepa, a partir de viales liofilizados, conservadas a 4°C, se realizó en agar TSA (Oxoid, Madrid, España), con posterior incubación a 30°C durante 24 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó un segundo cultivo, antes de realizar el ensayo. A las 48 h, se seleccionaron colonias aisladas para realizar una suspensión bacteriana de entre $1,5$ a 5×10^7 UFC/ml en agua de peptona tamponada (bioMerieux, Marcy-

l'Etoile, Francia) y usando un turbidímetro Densimat (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia). Se realizó un banco de diluciones, para obtener una confirmación de la carga microbiana de la solución bacteriana de ensayo, y se inocularon tarjetas de recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales, mediante el sistema TEMPO (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia). De la suspensión bacteriana, se diluyeron 0,1 ml en un tubo de agua de peptona tamponada (9 ml), para crear la solución bacteriana de ensayo.

Se añadió 1 ml de suspensión bacteriana de ensayo y 1 ml de agua desionizada estéril a 8 ml de CleanZIP (10 ml de volumen final). La concentración final del producto fue de 80%. El pH se ajustó a 8,5 antes de añadir la solución bacteriana de ensayo. El tiempo de contacto con el producto de limpieza fue de 20 min a 55°C en un baño termostático agitado Unitronic 320 OR (J.P Selecta S.A, Abrera, España).

Después de los 20 min de contacto, se retiró la solución de limpieza con bacterias del baño termostático y se realizó un banco de diluciones. De las diluciones seleccionadas, se inoculó un vial TEMPO TVC con 1 ml de muestra y 3 ml de medio de cultivo y se incubó a 30°C durante 48 h.

En el análisis UNE-EN 13697 se usó *Staphylococcus aureus* ATCC 6385 sobre discos de 2 cm de diámetro de acero inoxidable 316 2B. Siguiendo los mismos pasos seguidos en la UNE-EN 1040 para el cultivo de bacteriano, se realizó un cultivo sobre agar TSA para la recuperación de la cepa bacteriana, en dos pases sucesivos de 24 h a 30°C. Del último cultivo se realizó una suspensión bacteriana de $1,5-5 \times 10^8$ UFC/ml en agua de peptona tamponada (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia) y usando un turbidímetro Densimat (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia). Se realizó un banco de diluciones para obtener una

confirmación de la carga microbiana de la suspensión mediante el sistema TEMPO TVC (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia).

La solución bacteriana de ensayo se preparó mezclando 1 ml de la solución bacteriana con 1 mL de solución interferente estéril, compuesta por 3g/L de BSA (Albumina Sérica Bovina) (Sigma, Madrid, España). Se tomaron 0,05 ml de la solución bacteriana con BSA y se añadió sobre discos de acero inoxidable, dejándose secar durante 2 h a 37°C.

El producto de limpieza se formuló con CleanZip al 1% de concentración final, diluyéndolo en agua dura estéril. Compuesta por dos soluciones distintas, la primera por una solución de 19,84 g/L de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) (Sigma, Madrid, España) y 46,024 g/L de cloruro de calcio ($CaCl_2$) (Sigma, Madrid, España), y otra solución de 35,02 g/L bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (Sigma, Madrid, España). Una vez obtenidas las dos soluciones, se juntaron 6 ml de la primera solución y 8 ml de la segunda solución en un matraz aforado, se enrasó a 1 L, usando agua desionizada y ajustando el producto final conjunto a pH 8,5.

Sobre los discos secos, se añadieron 0,1 ml de producto de limpieza. Cada disco se colocó dentro de una placa de Petri, en una estufa a 55°C durante 20 min.

Una vez terminado el tiempo de contacto, cada uno de los discos se traspasaron asépticamente y de forma invertida a un frasco de plástico estéril con 5 g de perlas de vidrio estériles de 2 mm de diámetro (maximizando el contacto de las bacterias y las perlas) y 10 ml de neutralizante (polisorbato 80 (30 g/L), lecitina 3 g/L y L-histidina 1 g/L en agua desionizada). El frasco se agitó horizontalmente durante 1 min, a un máximo de 150 rpm/min.

Se dejó que el neutralizante detuviera la reacción durante 5 min. Del neutralizante se preparó un banco de diluciones y se inocularon viales TEMPO TVC, que fueron incubados durante 48 h a 30°C.

Cada una de las superficies, una vez neutralizadas, se recuperaron con pinzas estériles y se aclararon con 10 ml de agua desionizada estéril. Se traspasó la superficie a una placa de agar TSA, con la cara del ensayo boca arriba. Se añadieron 0,1 ml de agua desionizada estéril sobre la superficie y con una punta de micropipeta estéril se raspó durante 1 min la superficie para recuperar las posibles células bacterianas que permanecieron adheridas a la superficie, tras el ensayo. Una vez terminado el raspado, se añadió una segunda capa de agar TSA fundido (48-50°C) sobre el disco y se hizo un cultivo en doble capa. Las placas de Petri se incubaron durante 24 h a 37°C.

Para el control de la sobrevivencia de las células bacterianas después del secado, se realizó el mismo procedimiento, sustituyendo el producto de limpieza con agua dura a un pH 8,5. Después del tiempo de contacto se realizó la misma neutralización y cultivos posteriores, tanto en el sistema TEMPO como sobre agar TSA.

Para comprobar el posible efecto bactericida del neutralizante, se realizó una prueba previa al ensayo bactericida, que consistió en añadir, a un frasco de plástico estéril, 5 g de perlas de vidrio estériles de 2 mm de diámetro y 10 ml de neutralizante. Se añadieron 0,1 ml del producto enzimático CleanZip y se dejó que el neutralizante actuara durante 5 min. Inmediatamente, se añadió un disco con bacterias adheridas al frasco y se homogenizó durante 3 min a 150 rpm/min. Después se preparó un banco de diluciones del neutralizante y se inocularon viales TEMPO TVC de las diluciones elegidas.

Para el análisis microbiológico de la planta piloto, se atemperaron las muestras usadas para el análisis del extracto seco. A la vez que se realizó la cuantificación del contenido en las muestras de agua, se apartaron alícuotas de cada frasco para el estudio de fluorescencia de las muestras. Las aguas de limpieza y enjuague se analizaron microbiológicamente, se añadieron 10 ml de muestra en 90 ml de agua de peptona tamponada (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia).

Después de la homogenización de la muestra en un agitador, durante 30 s, se diluyó en tubos de 9 ml de agua de peptona tamponada (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia). De cada dilución se usaron 1 ml para inocular cada uno de los medios generales o selectivos empleados.

Los parámetros de los análisis fueron:

- Recuento total de aerobios (TVC) a 30°C durante 48h usando el método rápido TEMPO System (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia).
- Bacterias del ácido láctico (LAB) a 30°C durante 48h en medio MRS Agar (Oxoid, Madrid, España).
- Recuento de *Staphylococcus aureus* a 37°C durante 24h usando medio Baird Parker (BP) (Oxoid, Madrid, España) con el suplemento RPF (Oxoid, Madrid, España).
- Recuento de enterobacterias a 37°C durante 24h usando medio VRBG (Oxoid, Madrid, España).
- Hongos y levaduras a 20°C durante 120h en medio Sabouraud (SAB) con dextrosa y cloranfenicol (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francia).

1.7. Muestreadores internos para obtener muestras de fouling real.

Durante las pruebas en planta piloto, a parte del estudio del fouling lácteo mediante modelos de laboratorio, se creó un método para obtener muestras directamente del fouling lácteo del interior de la maquinaria, con la menor modificación de la maquinaria y de la forma más fácil posible.

Para ese fin, se diseñó sobre una lámina de acero inoxidable 316 2B de 1 mm de grosor (Figura 30), un elemento capaz de ser introducido en espacios cerrados, sin bloquear el flujo de líquido o granulados. Para ello se repartieron 6 orificios de 1,5 cm por la superficie de la lámina. El muestreador recibió un tratamiento de limpieza al igual que los modelos de laboratorio, descrito en la sección 1.2 Superficies para el fouling lácteo. Antes de su uso fue pesado mediante una balanza analítica.

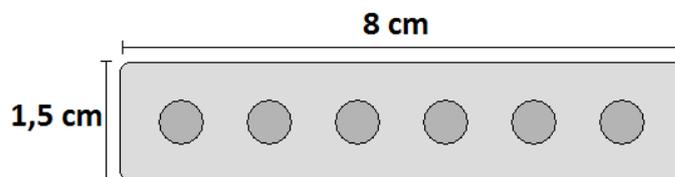


Figura 30. Esquema del muestreador interno para residuos.

Una vez preparado el muestreador, se introdujo en el interior de una canalización, en un punto donde no obstruyera el flujo ni donde la corriente pudiera moverlo, como puede ser en una tubería en forma de L (o codo).

1.8. Costes.

Los costes se calcularon con los porcentajes de productos químicos en cada uno de los ensayos, en función de los precios de fabricación proporcionados por la empresa Itram Higiene S.L.

2. Resultados y discusión.

Los resultados de esta última parte del proyecto resumen todo el trabajo realizado en todos los anteriores experimentos, desde la modelización del fouling, la identificación de los componentes de los residuos de la leche y las comparativas de eficacia de los productos de limpieza comercial actual y de nuevos productos, usando los modelos de fouling lácteo.

2.1. Concentración de residuo en los líquidos de limpieza del PTH.

Después de deshidratar las muestras recogidas durante la limpieza del PTH, se obtuvieron unos valores de peso, que una vez descartada la densidad media del producto de limpieza, se representaron en la siguiente gráfica (Figura 31).

Residuo seco de la limpieza

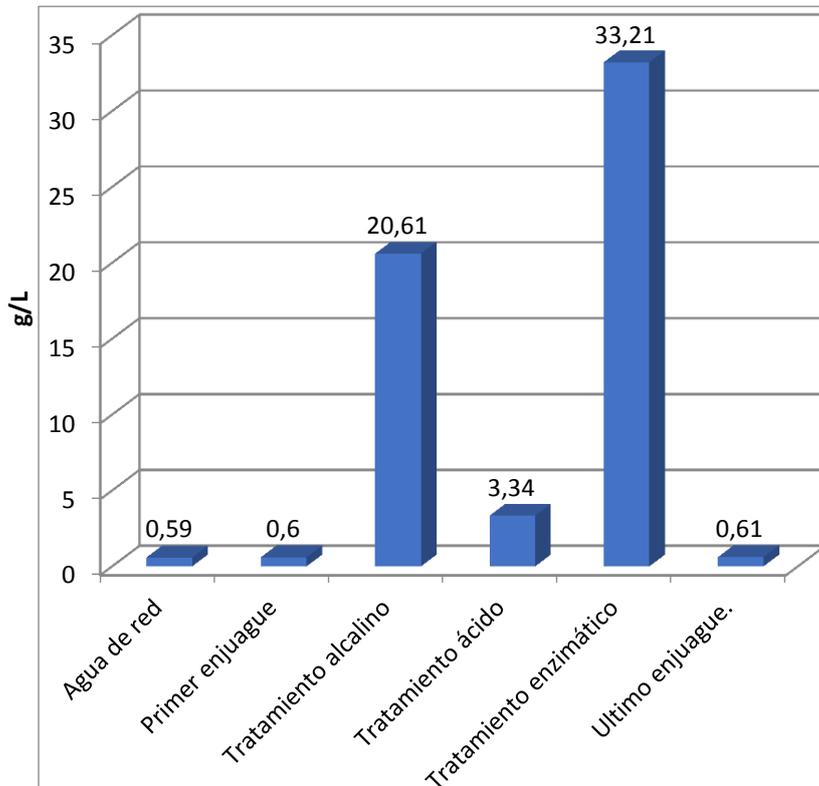


Figura 31. Concentración de residuo seco en las muestras obtenidas durante la limpieza.

Los resultados muestran que en el agua de red (0,59 g/L) y en el agua de los enjuagues (0,60-0,61 g/L) siempre se obtienen unos valores parecidos de residuos secos, más propios de la propia agua de red que del arrastre de materia derivada del procesado de la leche.

A la hora de eliminar los residuos adheridos a las superficies del PTH, se puede observar como el tratamiento alcalino extrae mucha más materia orgánica (20,61 g/L) que el tratamiento ácido (3,34 g/L). Como el tratamiento químico normalmente consiste en dos etapas (alcalino y ácido), para la comparación de los datos se podrían sumar los dos valores de eficacia (23,95 g/L totales) contra el valor obtenido por el tratamiento enzimático (33,21 g/L).

Los resultados indican que la cantidad de fouling lácteo extraído, mediante la nueva fórmula enzimática, es mucho mayor que en el caso del tratamiento químico en dos etapas. Mostrando, a su vez, que los resultados obtenidos en la sección IV y sobretodo en la sección V de este trabajo, con las que se evaluó la formación de fouling en laboratorio y se desarrolló una nueva fórmula enzimática, han sido plenamente eficaces para obtener un nuevo producto, así como las condiciones óptimas de trabajo. Nuestros resultados demuestran que la eficacia de un producto con amilasas apoya las hipótesis de partida, sobre composición y rol de ciertos residuos en la problemática del fouling lácteo, sobre todo en lo relacionado con el caramelo producido por el tratamiento térmico.

Todo ello ayuda al objetivo general de reducir las cantidades de agua y energía usada en la industria láctea, dada la menor cantidad de pasos de enjuague con la metodología enzimática, y al poder trabajar siempre a una menor temperatura y con tiempos más cortos.

2.2. Movilización del fouling derivado de la producción de leche en polvo.



Figura 32. Atomizador. A) Después de la producción de leche en polvo. B) Durante el primer enjuague. C) Después de la limpieza enzimática.

En el caso del atomizador (Figura 32), el agua de red (0,59-0,60 g/L) tenía valores similares a los obtenidos en el PTH. Y en el caso de los tratamientos químicos (5,10 g/L) y enzimáticos (5,30 g/L) tenían valores similares entre sí (Figura 32C).

En el caso del material eliminado por los productos de limpieza, se obtuvieron resultados parecidos en ambos casos, dado que el fouling derivado de la leche en polvo no tiene tanta adhesión como el generado por pasteurización/esterilización de leche líquida, aparte de que al ser una instalación muy distinta al PTH y al ser accesible de forma fácil, a través de las bocas de limpieza, se puede limpiar de forma más eficiente, incluso manual. Además, se evita tener que emplear métodos indirectos de evaluación de eficacia.

2.3. Análisis de los residuos.

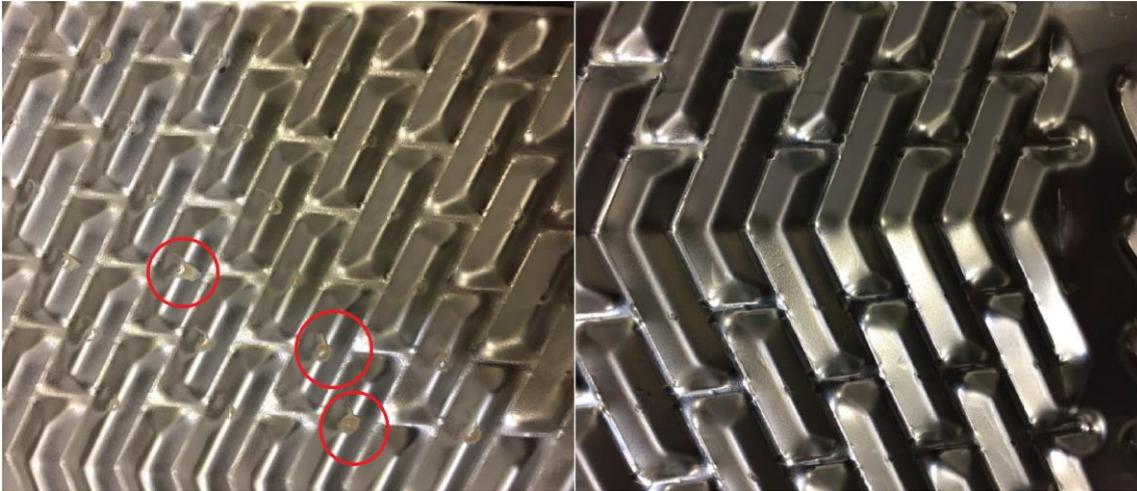


Figura 33. Fotografías del PHE (dos zonas distintas) después de la limpieza enzimática. Los círculos rojos indican unas pequeñas acumulaciones de una pasta residual pobremente adherida.

Después de los tratamientos térmicos, se abrieron los PTH y se separaron las placas, por donde fluye la leche durante los tratamientos, para observar la eliminación del fouling lácteo de forma directa (Figura 33). Este paso sólo se suele realizar cuando la limpieza lo exige. Una vez abierto, es necesario el cambio de las juntas estancas. Esto puede tener un coste de 2.000 € para una instalación pequeña, además de las horas de mantenimiento en que la maquinaria no funciona.

Alrededor de un 90% de la superficie para el tratamiento térmico estaba completamente limpia. El resto de la superficie contenía un depósito macroscópico blanco y de aspecto pastoso y blando (Figura 33). Al secarse formó unas escamas blancas, que se desprendían fácilmente de la superficie (Figura 34A). Se vio que el área afectada correspondía a las zonas que más temperatura recibían durante el proceso térmico.

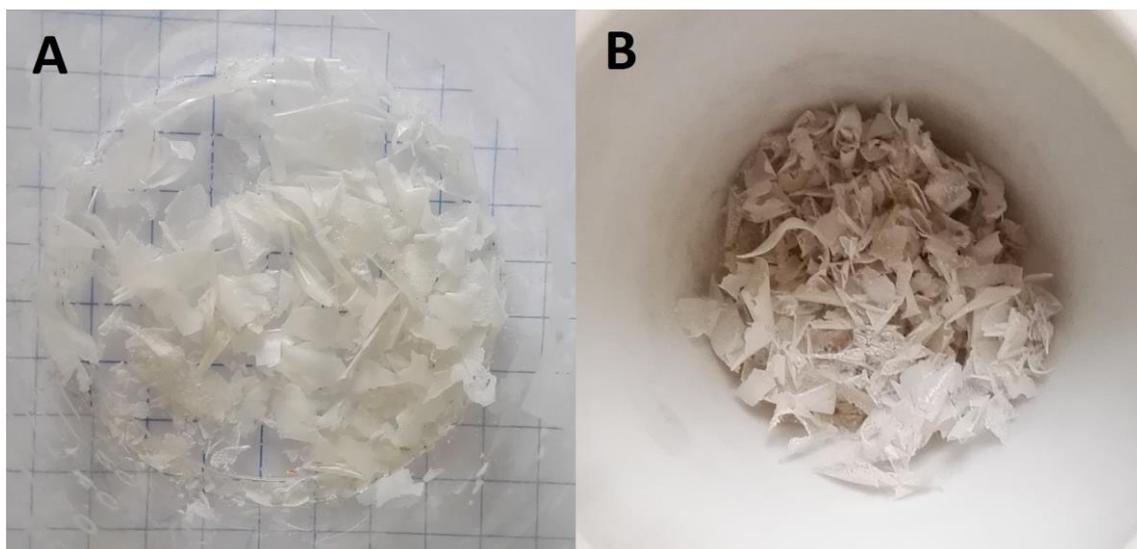


Figura 34. Residuos de fouling. (A) en forma de escamas y secos, después del proceso de limpieza enzimática. B) Escamas residuales una vez carbonizadas para analizar la fracción mineral.



Figura 35. Microfotografía mediante DEM y FITC de las escamas dejadas por el tratamiento enzimático. 10x.

Mediante el análisis de estas escamas blancas, se puede apreciar, después de un análisis mediante microscopía DEM (Figura 35), que las escamas tenían un alto contenido en proteína. A continuación, se realizó un perfil espectroscópico a partir de NIRS para las escamas (Tabla 11). Aunque el sistema no está

calibrado para esta matriz tan especial, puede ayudar a dar una idea inicial sobre los componentes predominantes.

Tabla 11. Composición aproximada de los componentes de las escamas dejadas por el tratamiento enzimático mediante NIRS (n=3).

Componente	Media (%)
Mineral	56,57
Proteína	23,06
Lípidos	15,37
Agua	5,00
Total	100,00

A partir de los resultados obtenidos, se buscó el contenido mineral del residuo, dado su color tan blanco. Se pesó una muestra de escamas (0.6016 g de muestra) y se introdujo en una mufla a 550°C, durante 5 h. Se procedió entonces al pesado de las cenizas, de forma inmediata (por triplicado), se había reducido el peso en un 45% aproximadamente. Previamente se dejó enfriar el horno, para evitar que se rehidratará con la humedad ambiental al abrirlo. El aspecto de las escamas resultantes fue una matriz casi idéntica a la muestra extraída del PTH, aunque con un ligero color gris (Figura 34B), indicando la gran cantidad de fracción mineral que contenía ese residuo.

Debido a estos resultados, después de comparar la efectividad de los productos enzimáticos contra los químicos tradicionales, se podría recomendar un tratamiento ácido, de forma semanal, como apoyo a la limpieza enzimática, garantizando una eliminación total del fouling orgánico y mineral. A pesar de proponer un producto químico para ayudar al enzimático, al no requerirse su

uso de forma diaria, se seguiría rebajando la cantidad de energía y agua empleada durante las limpiezas de mantenimiento de la instalación.

2.4. Resultados del análisis de fluorescencia.

A partir de fouling lácteo procedente del atomizador (leche en polvo desprendida de las paredes del atomizador), se realizaron mediciones para comprobar la presencia de los marcadores fluorescentes para riboflavina, triptófano, ditirosina y compuestos de Maillard en este tipo de residuos, con un resultado positivo para todos los fluoróforos.

Se analizaron las muestras en fluorescencia “front-face” (por la opacidad de la muestra) para correlacionar la intensidad de fluorescencia con la concentración de marcadores en el fouling de la leche en polvo, usando rectas patrón. Viéndose por ejemplo, una relación lineal para riboflavina o logarítmica para ditirosina.

Tabla 12. Valores de concentración de los marcadores fluorescentes en las distintas etapas de limpieza del pasteurizador.

Muestra	Concentración L-Trp (mg/L)	Concentración Rbf (mg/L)	Concentración MC (ml/L)	Concentración Dt (ml/L)
Agua de red	0,0457	0	0,25	0,23
Enjuague después de la pasteurización	0,0548	1,02	0,30	0,30
Solución alcalina	0,2240	2,36	0,76	0,97
Solución enzimática	0,2250	Fuera de escala	2,41	2,73
Enjuague después del tratamiento alcalino	0,0495	0,37	0,28	0,27
Enjuague después del tratamiento enzimático	0,0520	0,98	0,28	0,27
Solución ácida	0,0480	0,85	0,31	0,28
Enjuague después del tratamiento ácido.	0,0570	0,95	0,29	0,31

En las distintas muestras no se aprecian valores distintos entre el agua de red y los enjuagues, pero se observan valores mayores en las soluciones de limpieza química y enzimática. Estos valores podrían darse tanto por autofluorescencia de los productos de limpieza o por desprendimiento de fouling lácteo. La segunda opción es el más posible dado que los valores mayores que el agua de red se dan en los cuatro marcadores. El tratamiento ácido al desincrustar materia mineral en su mayoría, analizarlo por estos marcadores no sería lo más aconsejado.

Los resultados preliminares (Tabla 12) hasta el momento son prometedores, puesto que hay parámetros que podrían dar una idea del estado del proceso de limpieza. Estos son resultados provisionales, ya que esto no estaba en los objetivos iniciales de esta tesis. Sin embargo, observar que es posible medir y, por tanto, controlar el proceso, podría permitir llegar a ayudar a desarrollar un sensor para uso industrial, donde de forma no invasiva, se realice una medición "front-face" del proceso, monitorizándolo. Esto requerirá otro proyecto, que permita desarrollar una nueva herramienta, así como ampliar la investigación en el sentido de poder conseguir un proceso plenamente controlado "on line".

2.5. Resultados microbiológicos de la instalación.

Tabla 13. Resultados de los análisis normalizados de CleanZip contra *S. aureus*.

Muestra	Resultados
Solución bacteriana de ensayo (UNE 1040)	2.3x10 ⁶ cfu/ml
CleanZip 80% (UNE 1040)	0 cfu/mL
CleanZip 1% (UNE 13697)	1,25x10 ⁴ cfu/ml
Disco inoculado (UNE 13697)	2,44x10 ⁶ cfu/disco
Agua dura (UNE 13697) (control)	4,6x10 ⁵ cfu/ml
Disco tratado con CleanZip 1%	14 cfu
Disco control en agar TSA	30 cfu
CleanZip 1% neutralizado (UNE 13697)	1,6x10 ⁶ cfu/ml
Agua desionizada neutralizada (UNE 13697)	4,6x10 ⁵ cfu/ml

Según los resultados del ensayo en suspensión, para evaluar la eficacia bactericida (Tabla 13), el producto enzimático CleanZip al 80% consiguió una reducción de 6 logaritmos.

Esto tendrá un cierto interés para la comercialización del producto, ya que no es necesario un conservante químico para asegurar su estabilidad microbiológica. En cuanto a la concentración de uso, el CleanZip al 1%, era capaz de reducir las bacterias adheridas al disco en 5 órdenes de magnitud logarítmica. La diferencia entre los recuentos de bacterias adheridas y las suspendidas en el neutralizante,

se pueden deber al lavado con agua antes de la inclusión del disco entre las dos capas de agar TSA o por cierto efecto antimicrobiano.

El control del efecto del neutralizante obtuvo una neutralización efectiva del producto enzimático, al no revelar ningún tipo de actividad antimicrobiana.

Tabla 14. Resultados de los análisis microbiológicos (UFC/ml) de la limpieza de la planta piloto.

Muestra	Tvc	LAB	Enter	<i>S. aureus</i>	Mohos y levaduras
Leche cruda de vaca	$3,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^3$	4×10^3	<0	$2,6 \times 10^3$
Leche pasteurizada	$2,1 \times 10^4$	0	0	0	$1,6 \times 10^3$
Agua de red	$1,2 \times 10^1$	0	0	0	0
Enjuague pre-lavado	$1,2 \times 10^3$	0	0	0	0
Solución alcalina	0	0	0	0	0
Enjuague alcalino	$1,0 \times 10^0$	0	0	0	0
Solución ácida	0	0	0	0	0
Enjuague ácido	$3,4 \times 10^1$	0	0	0	0
Enjuague pre-lavado	$5,5 \times 10^1$	0	0	0	10
Solución enzimática	$4,0 \times 10^0$	$5,0 \times 10^0$	0	0	0
Enjuague enzimático	$1,0 \times 10^0$	0	0	0	1×10^1
Leche en polvo producida	$2,9 \times 10^2$	0	0	0	0
Residuos interior atomizador	1×10^2	0	0	0	0
Agua de red	0	0	0	0	0
Enjuague pre-lavado	$5,8 \times 10^1$	0	0	0	$1,0 \times 10^0$

Los resultados del análisis microbiológico del pasteurizador (Tabla 14) refleja, como ya se esperaba, que la mayor carga provenía de la materia prima, en este caso leche cruda de vaca. Después de la pasteurización se consiguió un

descenso de la carga de enterobacterias y LAB de 3 logaritmos. El recuento total de aerobios se redujo 1 logaritmo con el proceso térmico, mientras que los mohos y levaduras no sufrieron cambio alguno en los recuentos después de la pasteurización.

Teniendo en cuenta la carga microbiana del agua de red, se observó un arrastre con el primer enjuague de 1 logaritmo, estos resultados pueden provenir de la propia leche o de biofilms de la instalación. Pero dado que en los enjuagues finales no contienen una carga microbiana distinta a la del agua de red, parece más plausible que su origen esté en la leche cruda que en la formación de biofilms.

Durante los tratamientos químicos parece no haber ninguna carga microbiana, seguramente debido a los propios limpiadores, aunque el enjuague post-tratamiento ácido indica una carga de TVC, que podrían ser bacterias despegadas de las superficies por el tratamiento ácido y que estuvieran en forma de viables no cultivables (VNC) o de resistencia, lo que en esencia constituiría el biofouling residual.

La carga de microorganismos obtenida durante el tratamiento enzimático fue elevada, en comparación a los otros tratamientos químicos. Esto es explicable por el hecho de que las enzimas no tienen efecto antimicrobiano directo sobre las células, pero si desincrustante, eliminando cualquier forma de adhesión a superficie como puede ser EPS (Lequette y cols., 2010), proteínas de adhesión o el biofouling comentado anteriormente. Así, en el enjuague post-tratamiento enzimático, se obtuvieron valores parecidos a los del agua de red, indicando una buena limpieza microbiológica de la instalación con las enzimas.

Por tanto se puede concluir, que la eliminación de la contaminación microbiológica de la instalación es adecuada, tanto con el empleo de productos de limpieza química, como con la utilización de enzimas para la eliminación del fouling y el biofouling.

Los valores microbiológicos para la producción y limpieza del atomizador son muy bajos en general, dado que es una maquinaria más accesible que el PTH y que la acumulación de fouling, durante la producción, se controla mejor, con el uso de martillos hidráulicos, para despegar la leche en polvo adherida de las superficies.

2.6. Muestreadores internos para fouling lácteo.

Las pruebas en la planta piloto han demostrado, que este sencillo método, fácil de utilizar, puede ser una buena opción para identificar problemas de fouling real. No obstante, al colocarse en el flujo de la leche, se puede obstruir parcialmente la luz de la canalización. Esto hace que se pueda emplear para obtener una cierta cantidad de fouling, en condiciones reales. En cualquier caso, dependerá de la instalación y los equipos empleados.



Figura 36. Muestreadores de un pasteurizador. A) Después de 1 h a 105°C, produciéndose fouling lácteo tipo A. B) Después de 4 h a 135°C, produciéndose fouling lácteo tipo B.

En la Figura 36 se puede observar cómo se deposita, sobre el muestreador, el fouling lácteo producido por el tratamiento térmico aplicado. El fouling acumulado dependerá, en aspecto, del tratamiento térmico aplicado. En la imagen se puede observar cómo se deposita un fouling tipo A (Figura 36A), una masa de color blanco marfil; mientras que en el otro muestreador (Figura 36B) se deposita un fouling tipo B, mucho más mineral y granular, con una adhesión mucho menor que la vista en el fouling tipo A.

2.7. Costes de limpieza.

Tabla 15. Costes de los productos empleados para los tratamientos de limpieza contra el fouling lácteo A fecha de Octubre de 2016.

Nombre del Producto	Componente	Concentración de uso (%)	Kg/200 L	€/Kg	Coste total (€)
Brio Complex	Alcalino	3,0	6	1,56	9,36
Acimix	Ácido	1,0	2	1,42	2,84
CleanZip	Enzimas y tensoactivos	1,0	2	4,5	9,00
ENTHALPY Buffer	Tampón	3,0	6	1,5	9,00

Los resultados de los costes derivados de la limpieza de la planta piloto (Tabla 15), muestran que el coste del tratamiento químico alcalino, por separado (9,36€) o combinando alcalino-ácido (12,20€) son relativamente elevados. El tratamiento enzimático (9€) más el medio tamponador (9€) para su uso efectivo (18€) acumula unos costes directos de producto más altos para este experimento, que los derivados del uso de los productos químicos.

Esto se debe al elevado coste del tampón elegido para uso industrial, pero el tampón se puede llegar a diluir sin pérdida de efectividad hasta 1/10 (como estrategia de ahorro para futuros usos). Esta reducción de la concentración de uso de tampón rebajaría muchísimo los costes directos (9,90€), lo que lo haría más competitivo que los tratamientos actuales, con una reducción de coste del 25%.

VII: Conclusiones

1. El modelo de fouling lácteo desarrollado, a escala de laboratorio, es una forma rápida, sencilla y económica de generar, una cantidad de fouling adecuada y representativa de los tratamientos térmicos industriales, permitiendo estudiar al detalle la composición de los residuos adheridos, su distribución espacial y comparar diferentes tratamientos para garantizar su eliminación.
2. El modelo de generación desarrollado, consiguió acumular una cantidad de fouling importante, superior a otros modelos publicados en la bibliografía.
3. Según los resultados obtenidos, la lactosa juega un papel importante en la formación y adhesión del fouling a las superficies. El calor transmitido, a través de las paredes del sistema de transferencia de calor, provoca la caramelización del azúcar, con formación de compuestos de Mallard, que actuarían como aceleradores del proceso.
4. La composición del fouling es diferente, dependiendo de la profundidad de la capa estudiada. En las capas en contacto con la superficie metálica, domina la presencia de azúcares caramelizados, con una baja concentración de proteína. Conforme nos vamos alejando de la superficie metálica, hay una reducción progresiva del caramelo y un incremento de la proteína. La grasa se localiza en las zonas más superficiales.
5. La aplicación de microscopia CLSM, junto a colorantes fluorescentes específicos para distintos componentes de los alimentos, se ha mostrado como una gran herramienta para conocer la composición del fouling y su distribución. Esto permite evaluar diferentes soluciones a un problema complejo.

6. La evaluación de diferentes productos químicos, sobre el fouling generado en laboratorio, ha permitido desarrollar nuevas fórmulas enzimáticas, con una eficacia equivalente a los tratamientos químicos actuales.
7. Se ha conseguido desarrollar un nuevo producto, de gran eficacia en condiciones reales de uso, a partir de diferentes formulaciones a escala de laboratorio. Los resultados obtenidos, tanto en la eliminación del fouling lácteo del pasteurizador, como del atomizador, reflejan un buen resultado de la fórmula enzimática. Además, se consigue una reducción de los microorganismos presentes en la instalación, lo que también ayudará al mantenimiento de las condiciones higiénicas de la instalación.
8. La nueva fórmula enzimática desarrollada cumple con el objetivo principal del proyecto europeo ENTHALPY, es decir, reducir significativamente el consumo de agua y energía en los procesos de limpieza de la industria lechera.
9. La metodología recogida en este trabajo podría ser aplicada, igualmente, para otros residuos generados durante el procesado de alimentos. De esta forma, modelizar la generación de residuos, permitiría diseñar soluciones específicas para la eliminación de residuos.

VIII: Bibliografía

1. Albalasmeh, A. A., Berhe, A. A. & Ghezzehei, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* **97**, 253–261 (2013).
2. Anónimo. *ALVIM Biofilm Monitoring System*. (2012).
3. Anónimo. UNE-EN 13697. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar. 36 (2015).
4. Anónimo. UNE-EN 1040. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1). 44 (2006).
5. Anónimo. Medio siglo de la leche UHT en España. *ABC* (2014). at <<http://www.abc.es/sociedad/20140923/abci-medio-siglo-lecheuht-espana-201409221811.html>>
6. Anónimo. Fouling factor negli scambiatori a piastre. *Tempco Solid Temperature* (2007). at <<http://www.tempcoblog.it/54/fouling-factor-negli-scambiatori-a-piastre/>>
7. Anónimo. Pasteurization. *IDFA* (2017). at <<http://www.idfa.org/news-views/media-kits/milk/pasteurization>>
8. Anónimo. *Informe del consumo de alimentación en España 2015*. (2016). at <http://www.mapama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/informeconsumoalimentacion2015_tcm7-422694.pdf>
9. Anónimo, B. Universal Protease Activity Assay: Casein as a Substrate (Sigma). *www.sigmaaldrich.com* (2016).
10. Anónimo, B. *Clarification of milk. TetraPack 1*, (2017).
11. Anonymous. Reglamento EC 1935/2004 sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Official Journal of the European Union* **14** (2004).
12. Argüello, M. A., Álvarez, S., Riera, F. A. & Álvarez, R. Enzymatic cleaning of inorganic ultrafiltration membranes used for whey protein fractionation. *J. Memb. Sci.* **216**, 121–134 (2003).
13. Auty, M. A. E., Twomey, M., Guinee, T. P. & Mulvihill, D. M. Development and application of confocal scanning laser microscopy methods for studying the distribution of fat and protein in selected dairy products. *J. Dairy Res.* **68**, 417–427 (2001).
14. Ayala, N., Zamora, A., González, C., Saldo, J. & Castillo, M. Predicting lactulose concentration in heat-treated reconstituted skim milk powder using front-face fluorescence. *Food Control* **73**, 110–116 (2017).
15. Baier, R. E. in *Adsorption of microorganisms to surfaces* 59–104 (1980).
16. Baier, R. E. Surface behaviour of biomaterials: The theta surface for biocompatibility. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **17**, 1057–1062 (2006).

17. Bansal, B. & Chen, X. D. A critical review of milk fouling in heat exchangers. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **5**, 27–33 (2006).
18. Barabás, J. An alternative method of milk treatment. *FAO* (1995). at <http://www.fao.org/AG/AGa/AGAP/FRG/FEEDback/War/v6200b/v6200b0t.htm#bibliography>
19. Barish, J. A. & Goddard, J. M. Anti-fouling surface modified stainless steel for food processing. *Food Bioprod. Process.* **91**, 352–361 (2013).
20. Basso, M., Simonato, M., Furlanetto, R. & De Nardo, L. Study of chemical environments for washing and descaling of food processing appliances: An insight in commercial cleaning products. *J. Ind. Eng. Chem.* **53**, 23–36 (2017).
21. Beech, I. B. & Sunner, J. Biocorrosion: Towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 181–186 (2004).
22. Belmar-Beiny, M. T., Gotham, S. M., Paterson, W. R., Fryer, P. J. & Pritchard, A. M. The effect of Reynolds number and fluid temperature in whey protein fouling. *J. Food Eng.* **19**, 119–139 (1993).
23. Berlinghieri, C. & Elena, F. in *The first Mediterranean islanders: initial occupation and survival strategies* (ed. Phoca-Cosmetatou, N.) (University of Oxford School of Archaeology, 2011).
24. Bott, T. R. *Fouling of heat exchangers*. (Elsevier, 1995).
25. Bouman, S., Lund, D. B., Driessen, F. M. & Schmidt, D. G. Growth of thermoresistant streptococci and deposition of milk constituents on plates of heat exchangers during long operating times. *J. Food Prot.* **9**, 788–883 (1982).
26. Boyce, A., Piterina, A. V & Walsh, G. Assessment of the potential suitability of selected commercially available enzymes for cleaning-in-place (CIP) in the dairy industry. *Biofouling* **26**, 837–50 (2010).
27. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
28. Brady, R. F. Properties which influence marine fouling resistance in polymers containing silicon and fluorine. *Prog. Org. Coatings* **35**, 31–35 (1999).
29. Brans, G., Schroën, C. G. P. H., Van Der Sman, R. G. M. & Boom, R. M. Membrane fractionation of milk: State of the art and challenges. *J. Memb. Sci.* **243**, 263–272 (2004).
30. Britten, M. *et al.* Deposit formation on heated surfaces: effect of interface energetics. *J. Dairy Res.* **55**, 551–562 (1988).
31. Brooks, J. D. & Flint, S. H. Biofilms in the food industry: Problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **43**, 2163–2176 (2008).
32. Burton, H. Deposits from Whole milk in Heat Treatment Plant: A Review and Discuccion. *J. Dairy Res* **34**, 137–143 (1967).
33. Bylund, G. *Dairy processing handbook*. (Tetra Pak Processing Systems AB, 1995).

34. Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., Koot, A. & Van Ruth, S. M. Targeted and Untargeted Detection of Skim Milk Powder Adulteration by Near-Infrared Spectroscopy. *Food Anal. Methods* **8**, 2125–2134 (2015).
35. Changani, S. D., Belmar-Beiny, M. T. & Fryer, P. J. Engineering and chemical factors associated with fouling and cleaning in milk processing. *Exp. Therm. Fluid Sci.* **14**, 392–406 (1997).
36. Characklis, W. G. in *Biofilms* 551–560 (1990).
37. Ciferri, O. Microbial Degradation of Paintings Microbial Degradation of Paintings. **65**, 2276–2278 (1999).
38. Cólho, D. F. *et al.* Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
39. Collantes, F. La evolución del consumo de productos lácteos en España, 1952-2007. *Rev. Hist. Ind.* **55**, 103–134 (2014).
40. Costerton, J. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* **41**, 435–464 (1987).
41. Coutts, A. D. M. & Taylor, M. D. A preliminary investigation of biosecurity risks associated with biofouling on merchant vessels in New Zealand. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* **38**, 215–229 (2004).
42. De Gennes, P. G. Waterring: statics and dynamics. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 827–863 (1985).
43. De Jong, P. Impact and control of fouling in milk processing. *Trends Food Sci. Technol.* **8**, 401–405 (1997).
44. de Jong, P. & Van der Linden, H. J. L. J. Design and operation of reactors in the dairy industry. *Chem. Eng. Sci.* **47**, 3761–3768 (1992).
45. De Schweinitz, E. A. The pasteurization and sterilization of milk. 26 (1895). at <<https://naldc.nal.usda.gov/download/IND23303998/PDF>>
46. Delplace, F., Leuliet, J. C. & Levieux, D. A reaction engineering approach to the analysis of fouling by whey proteins of a six-channels-per-pass plate heat exchanger. *J. Food Eng* **34**, 91–108 (1997).
47. Ding, Y., Tian, Y., Li, Z., Zuo, W. & Zhang, J. A comprehensive study into fouling properties of extracellular polymeric substance (EPS) extracted from bulk sludge and cake sludge in a mesophilic anaerobic membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* **192**, 105–114 (2015).
48. Dobretsov, S., Abed, R. M. M. & Teplitski, M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. *Biofouling* **29**, 423–41 (2013).
49. Doumèche, B., Galas, L., Vaudry, H. & Di Martino, P. Membrane Foulants Characterization in a Drinking Water Production Unit. *Food Bioprod. Process.* **85**, 42–48 (2007).
50. D’Souza, N. M. & Mawson, A. J. Membrane cleaning in the dairy industry: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 125–134 (2005).
51. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**, 350–356 (1956).

52. Epstein, N. in *Fouling: technical aspects*. 110–119 (Hemisphere, 1981).
53. Evers, J. M. *et al.* Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *Int. Dairy J.* **18**, 1081–1089 (2008).
54. Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J. & de Nys, R. The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling* **28**, 649–669 (2012).
55. Fitzpatrick, J. J. *et al.* Glass transition and the flowability and caking of powders containing amorphous lactose. *Powder Technol.* **178**, 119–128 (2007).
56. Fleming, R. S. The Spray Process of Drying. *J. Ind. Eng. Chem.* **13**, 447–449 (1921).
57. Flemming, H. C. Biofouling in water systems - Cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 629–640 (2002).
58. Foster, C. L., Britten, M. & Green, M. L. A model heat-exchange apparatus for the investigation of fouling of stainless steel surfaces by milk I. Deposit formation at 100 °C. *J. Dairy Res.* **56**, 201 (1989).
59. Foster, C. L. & Green, M. L. A model heat exchange apparatus for the investigation of fouling of stainless steel surfaces by milk II. Deposition of fouling material at 140 °C, its adhesion and depth profiling. *J. Dairy Res.* **57**, 339–348 (1990).
60. Fox, P. F. & McSweeney, P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. (Thomson Science, 1998).
61. Fryer, P. J. & Asteriadou, K. A prototype cleaning map: A classification of industrial cleaning processes. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 255–262 (2009).
62. Fryer, P. J. Modelling the behaviour of heat exchangers undergoing scaling. *Geothermics* **18**, 89–96 (1989).
63. Gallier, S. *et al.* A novel infant milk formula concept: Mimicking the human milk fat globule structure. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **136**, 329–339 (2015).
64. Georgiadis, M. C. & Macchietto, S. Dynamic modeling and simulation of plate heat exchangers under milk fouling. *Chem. Eng. Sci.* **55**, 1605–1619 (2000).
65. Graßhoff, A. Enzymatic cleaning of milk pasteurizers. *Icheme* **80**, 247–252 (2002).
66. Guerrero-Navarro A.E., Ríos.-Castillo. A. G. & J.J, Rodríguez.-Jerez. Enhanced cleaning protocols in the dairy industry. Developing a method for the evaluation of cleaning procedures at laboratorial scale. in *EFFoST 29th* (Elsevier, 2015).
67. Guerrero-Navarro, A. E., Rios-Castillo, A. G., Ripollés-Ávila, C. & Rodríguez-Jerez, J. J. Composition of the fouling formed on surfaces of milk facilities. A model for the development of new products for specific cleaning. in *EFFoST 30th* (Elsevier, 2016).
68. Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Vaillant, V., Astagneau, E. D. & Bouvet, P. Food poisoning incidents in France in 1998. *Bull Epidemiol Hebdomad* 65–70 (2001).
69. Hagsten, C. *et al.* Composition and structure of high temperature dairy fouling. *Food Struct.* **7**, 13–20 (2016).
70. Hall, C. W. & Trout, G. M. *Milk pasteurization*. (AVI Pub. Co., 1968).

71. Hinton, A. R., Trinh, K. T., Manderson, G. J. & Brooks, J. D. Thermophile growth in the preheating section of a milk powder pilot plant. in *Proceedings of 6th World Congress of Chemical Engineering* (2001).
72. Holsinger, V. H., Rajkowski, K. T. & Stabel, J. R. Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Rev. Sci. Tech. I'OIE* **16**, 441–451 (1997).
73. Itan, Y., Powell, A., Beaumont, M. A., Burger, J. & Thomas, M. G. The origins of lactase persistence in Europe. *PLoS Comput. Biol.* **5**, 17–19 (2009).
74. Jefferson, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **236**, 163–173 (2004).
75. Jimenez, M. *et al.* Toward the understanding of the interfacial dairy fouling deposition and growth mechanisms at a stainless steel surface: A multiscale approach. *J. Colloid Interface Sci.* **404**, 192–200 (2013).
76. Jun, S. & Puri, V. M. Fouling Models for Heat Exchangers in Dairy Processing: A Review. *J. Food Process Eng.* **28**, 1–34 (2005).
77. Kolter, R. & Greenberg, E. P. Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature* **441**, 300–302 (2006).
78. Kwan, S. E., Bar-Zeev, E. & Elimelech, M. Biofouling in forward osmosis and reverse osmosis: Measurements and mechanisms. *J. Memb. Sci.* **493**, 703–708 (2015).
79. Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M. & Faille, C. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* **26**, 421–431 (2010).
80. Liu, W., Fryer, P. J., Zhang, Z., Zhao, Q. & Liu, Y. Identification of cohesive and adhesive effects in the cleaning of food fouling deposits. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **7**, 263–269 (2006).
81. Liu, Z., Gonzalez, J. S., Wang, H., Gunasekaran, S. & Runge, T. Analytical Methods Dairy manure protein analysis using UV-vis based on the Bradford method. *Anal. Methods* **7**, 2645–2652 (2015).
82. Lowry, H; J, Nira;A, Rosebrough; Farr, Lewis and Randall, J. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *Anal. Biochem.* **217**, 220–230 (1994).
83. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein estimation by Lowry's method. *J Biol Chem* **193**, 265–275 (1951).
84. Lurie, J. *Handbook of analytical chemistry.* (Mir Publishers, 1975).
85. Madigan, M. T., Martinko, J.M. & Bender, S. K. *Brock biology of microorganisms.* (Pearson Education, Inc, 2012).
86. Magin, C. M., Cooper, S. P. & Brennan, A. B. Non-toxic antifouling strategies. *Mater. Today* **13**, 36–44 (2010).
87. Martins, A. Calculan en 8,7 millones el número de especies del planeta. *BBC Mundo* (2011). at http://www.bbc.com/mundo/noticias/2011/08/110824_especies_censo_am.shtm
88. Masuko, T. *et al.* Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Anal. Biochem.* **339**, 69–72 (2005).

89. Monroe, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **5**, 2458–2461 (2007).
90. Morales, F. J., Romero, C. & Jiménez-Pérez, S. Fluorescence associated with Maillard reaction in milk and milk-resembling systems. *Food Chem.* **57**, 423–428 (1995).
91. Nagata, A. *et al.* Comparative study on caustic and enzymatic cleanings of stainless steel surface fouled with beta-lactoglobulin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 2277–2281 (1995).
92. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger Principios de la Bioquímica*. (Omega, 2014).
93. Nguyen, H. T. H. *et al.* Buffalo milk fat globules and their biological membrane: In situ structural investigations. *Food Res. Int.* **67**, 35–43 (2015).
94. Nos, N. R. & Pujol, J. El consumo de leche fresca en Cataluña entre mediados del siglo XIX y 1936 : la difusión de un nuevo alimento. 1–32 (2006).
95. Nutman, A. P., Bennett, V. C., Friend, C. R. L., Van Kranendonk, M. J. & Chivas, A. R. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature* **537**, 535–538 (2016).
96. Oftedal, O. T., Eisert, R. & Barrell, G. K. Comparison of analytical and predictive methods for water, protein, fat, sugar, and gross energy in marine mammal milk. *J. Dairy Sci.* **97**, 4713–4732 (2014).
97. Ölmez, H. & Kretzschmar, U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Sci. Technol.* **42**, 686–693 (2009).
98. Pearce, K. N. *Milk powder*. *New Zealand Institute of Chemistry* (2014). at <<https://nzic.org.nz/>>
99. Porcelli, N. & Judd, S. Chemical cleaning of potable water membranes: A review. *Sep. Purif. Technol.* **71**, 137–143 (2010).
100. Reingruber, A. Early Neolithic settlement patterns. 291–305 (2011).
101. Ríos-Castillo, A. G., González-Rivas, F. & Rodríguez-Jerez, J. J. Bactericidal Efficacy of Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria on Stainless Steel Surfaces. *J. Food Sci.* **0**, (2017).
102. Rodríguez-Jerez, J. J., Ríos-Castillo, A. G. & Guerrero-Navarro, A. E. Process for removing the fouling deposited in a milk processor unit and a cleaning solution used therein. (2016).
103. Rodríguez-Jerez, J. J., Ríos-Castillo, A. G. & Guerrero-Navarro, A. E. Process for removing the fouling deposited in a milk processor unit and a cleaning solution used therein. (2017).
104. Šafařík, I. & Šantrůčková, H. Direct determination of total soil carbohydrate content. *Plant and Soil* **143**, 109–114 (1992).
105. Sarg, J. *A new dairy industry*. (W.T. Barion and Co., 1896).
106. Spiteri, C. D. *et al.* Regional asynchronicity in dairy production and processing in early farming communities of the northern Mediterranean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 13594–13599 (2016).
107. Stack, A. & Sillen, G. Bactofugation of liquid milks. *Nutr. Food Sci.* **98**, 280–282 (1998).

108. Straub, K. L., Benz, M. & Schink, B. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *FEMS Microbiol Ecol* **34**, 181–186 (2001).
109. Sutherland, I. W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology* **147**, 3–9 (2001).
110. Takahashi, T., Nagai, T., Sakiyama, T. & Nakanishi, K. Desorption Behavior of Deposit Formed from Coffee Drinks on Stainless Steel Surfaces. *Food Sci. Technol. Int.* **2**, 120–123 (1996).
111. Takahashi, T., Nagai, T., Sakiyama, T. & Nakanishi, K. Formation of Fouling Deposit from Several Soft Drinks on Stainless Steel Surfaces. *Food Sci. Technol. Int.* **2**, 116–119 (1996).
112. Tamime, A. *Cleaning-in-Place: Dairy, Food and Beverage Operations*. (Blackwell Publishing Ltd, 2008). doi:10.1002/9781444302240
113. Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R. & Vieira, M. physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiol.* **22**, 247–251 (2005).
114. Thomas, E. A., Weislogel, M. M. & Klaus, D. M. Design considerations for sustainable spacecraft water management systems. *Adv. Sp. Res.* **46**, 761–767 (2010).
115. Timperley, D. A., Hasting, A. P. M. & Goederen, G. D. Developments in the cleaning of Dairy Sterilization Plant. *Int. J. Dairy Technol.* **47**, 44–50 (1994).
116. Turner, G., Handley, D., Newcombe, J. & Ozdemiroglu, E. *Valuation of the external costs and benefits to health and environment of waste management options*. (2004).
117. Van Asselt, A. J., Van Houwelingen, G. & Te Giffel, M. C. Monitoring System for Improving Cleaning Efficiency of Cleaning-in-Place Processes in Dairy Environments. *Food Bioprod. Process.* **80**, 276–280 (2002).
118. Van Asselt, A. J., Vissers, M. M. M., Smit, F. & de Jong, P. In-line control of fouling. in *Proceedings of heat exchanger fouling and cleaning—challenges and opportunities* (Engineering Conferences International, 2005).
119. Vásquez Caicedo, A. L. EnReMilk: Integrated engineering approach validating reduced water and energy consumption in milk processing for wider food supply chain replication- Project overview and key results update.. in *SUSMILK Final Conference* (2016).
120. Visser, J. & Jeurnink, T. J. M. Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Exp. Therm. Fluid Sci.* **14**, 407–424 (1997).
121. Waters, J. C. Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **185**, 1135–1148 (2009).
122. Weidema, B. P., Wesnae, M., Hermansen, J., Kristensen, I. & Halberg, N. *Environmental improvement potentials of meat and dairy products*. *JRC Scientific and Technical Reports* (2008). doi:10.2791/38863
123. Westhoff, D. C. Heating Milk for Microbial Destruction : A Historical Outline and Update. *J. Food Prot.* **41**, 122–130 (1978).

124. Whitehurst, R. J., Law, V. O. *Enzymes in Food Technology*. (Sheffield Academic Press CRC Press, 2009).
125. Willey, J. M. *Microbiología de Prescott, Harley y Klein*. (2009).
126. Zhang, X., Bishop, P. L. & Kupferle, M. J. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci. Technol.* **37**, 345–348 (1998).

