

INVENTARIADO

POR:

30/11/15

Litiane O.

21-12-17



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS



CIB



D-24256

T
663.42
CEL

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

INSTITUTO DE TECNOLOGIAS

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLOGICAS

INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES

Previo a la obtención del título de
Tecnólogo en Alimentos

Realizado en: COMPANIA DE CERVEZAS NACIONALES C.A.

Autor: CAROLA /CELLERI CEDAÑO

Mariela Reyes L.

Anamaria Costa

Profesor guía: MARIELA REYES Segunda revisión: ANAMARIA COSTA

AÑO LECTIVO

1994 - 1995

GUAYAQUIL - ECUADOR



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLOGICAS

Guayaquil, 20 de julio de 1994

Doctora
Gloria Bajaña
Coordinadora del Programa de
Tecnología en Alimentos
Escuela Superior Politécnica del Litoral
Guayaquil

De mis consideraciones:

Adjunto a la presente le estoy enviando el Informe de mis Prácticas Profesionales, las mismas que fueron realizadas en la Compañía de Cervezas Nacionales C.A., siendo éste requisito indispensable para la obtención del título de Tecnólogo en Alimentos.

En este trabajo se incluye las actividades que realicé en esta Compañía desde el 7 de Abril hasta el 7 de Julio del presente año.

Esperando cumplir con los requisitos para presentar este informe, me suscribo a Usted,

Atentamente

Carola Celleri

Carola Céleri Cedeño



INDICE

Resumen.....	I
Introducción.....	II
Detalle del trabajo realizado.....	3
Breve descripción del proceso.....	4
Diagrama de flujo del proceso.....	7
Descripción de los puntos de control.....	8
Recuento de Gérmenes aerobios totales.....	10
Determinación de la población bacteriana en levadura.....	12
Determinación del porcentaje de células muertas en levadura.....	14
Técnica para la identificación de Células de respiración de- ficiente en levadura.....	16
Determinación de coliformes en agua y en cerveza.....	18
Número más probable.....	19
Supervisión de aseos mediante frotis.....	21
Propagación del cultivo puro de levadura.....	23
Determinación de la estabilidad microbiológica del mosto.....	25
Cálculo de la concentración de células de levadura.....	26
Recuento de gérmenes perjudiciales para la cerveza.....	29
Recuento de mohos y levaduras en agua.....	31
Aspectos generales de la empresa.....	33
Organigrama de funciones.....	35
Conclusiones y recomendaciones.....	36
Bibliografía.....	37
Anexos.....	38

RESUMEN

El presente informe de Prácticas Profesionales, las mismas que fueron realizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Compañía de Cervezas Nacionales C.A., conlleva gran parte informativa del proceso de elaboración de Cerveza y una serie detallada de análisis realizados por el laboratorio anteriormente mencionado, con la finalidad de mantener un estricto control de la calidad microbiológica del producto. Los análisis efectuados involucran el agua tratada y la producción de cerveza a partir del mosto recibido en bodega de frío .

En este trabajo se esquematiza el proceso de elaboración mediante diagramas de flujo, en los cuales se visualizan los puntos críticos y los análisis que ellos conllevan, siendo éstos responsabilidades del Departamento de Microbiología.

A continuación, se explica en forma clara y detallada cada uno de estos análisis y las diferentes actividades que realiza el Laboratorio de Microbiología en la empresa, como es el manejo de la levadura cervecera y la supervisión de los aseos.

La información aquí expuesta proviene de una amplia gama de folletos técnicos proporcionados por la empresa y de la bibliografía referente al tema.



INTRODUCCION

La cerveza es uno de los productos más vendidos a nivel mundial, el mismo que es obtenido mediante la fermentación alcohólica de la cebada malteada, lúpulo y agua. En el Ecuador la Compañía de Cervezas Nacionales C.A. es la que elabora las cervezas de mayor aceptación por los consumidores ecuatorianos y que está comenzando a ser exportada a países de América Latina y E.E.U.U..

En el proceso de elaboración de Cerveza el control del producto es fundamental, labor que se realiza a través de los laboratorios de Microbiología y Control de Calidad.

Esto permite garantizar el producto desde el punto de vista químico, físico, organoléptico y microbiológico, logrando de esta manera que el mismo sea aceptado por el mercado nacional e internacional cumpliendo con los más estrictos requerimientos de Calidad. Para lograrlo es necesario contar con técnicos preparados, métodos adecuados de trabajo y equipos modernos que agilicen la labor.

El laboratorio de Microbiología es de mucha importancia en la empresa cervecera, ya que es el que controla el manejo de la levadura, instrumento indispensable en la fermentación del mosto para la producción de la cerveza y controla además la calidad microbiológica del producto durante el proceso.

El presente informe tiene como objetivo principal, describir detalladamente, los diferentes análisis de control microbiológico, que se realizan durante la elaboración de la cerveza, y de las diversas actividades que cumple el Laboratorio de Microbiología dentro de la empresa.



BIBLIOTECA
DE CIENCIAS TECNOLÓGICAS

DETALLE DEL TRABAJO REALIZADO

Mi labor en la Compañía de Cervezas Nacionales C.A. comprendió responsabilidades asignadas hacia el Laboratorio de Microbiología, el mismo que realiza análisis específicos tanto para la cerveza en producción y producto terminado como para el agua de limpieza de los equipos y tanques de fermentación y almacenamiento; además, del control y propagación de la levadura utilizada en los procesos de fermentación.

De manera concreta mi trabajo se resume en los siguientes puntos:

- Toma de muestras para los controles microbiológicos.
- Control microbiológico del mosto, cerveza en maduración, cerveza filtrada, embotellada y pasteurizada.
- Control microbiológico de las aguas utilizadas en la limpieza de los equipos y tanques.
- Preparación de los medios de cultivo y del material necesario para la inoculación de muestras.
- Control de la levadura de cosecha mediante la dereminación de la población bacteriana y del porcentaje de células muertas.
- Cálculo de la concentración de células de levadura en la cerveza en maduración próxima a ser filtrada.
- Propagación del cultivo puro de levadura procedente de Babaria-Colombia para la fermentación del mosto.
- Supervisión del aseo de tanques y barriles de cerveza mediante frotis.
- Supervisión del aseo de las líneas de envase mediante frotis o inoculación del agua residual y la prueba de fenolftaleína para determinar la presencia de soda.
- Determinar la calidad de la levadura de cosecha mediante la identificación de células de respiración deficiente.
- Control de la estabilidad microbiológica del mosto procedente de los enfriadores.

Todos los análisis aquí expuestos son explicados detalladamente a lo largo de este informe. El presente trabajo fue realizado a nivel de Practicante durante un lapso de tres meses sin remuneración económica, pero que constituyó una importante experiencia que aportó grandes conocimientos para mi futuro desenvolvimiento profesional.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

BREVE DESCRIPCION DEL PROCESO

Los componentes más importantes de la cerveza son: Agua, cebada malteada, adjuntos, lúpulo y levadura cuidadosamente cultivada. La fabricación consta de las siguientes etapas:

- I. Recibo de la cebada y almacenamiento
- II. Elaboración de la Malta
- III. Elaboración de la Cerveza: Elaboración del Mosto
 Fermentación del Mosto
- IV. Envase

RECIBO Y ALMACENAMIENTO DE LA CEBADA:

La cebada se recibe en la Cervecería, se somete a una limpieza, secado, clasificación y almacenaje en silos.

ELABORACION DE LA MALTA:

En la elaboración de la malta se siguen los siguientes etapas: Remojo, germinación, tostación y desgerminación.

La etapa del remojo se hace para suministrar a la cebada la cantidad de agua y aire suficiente para iniciar la germinación. Una vez terminada esta etapa se envía la cebada a unas cajas de gran tamaño, llamadas saladines donde va a recibir riegos de agua y aire saturado de humedad para que germine el grano.

Terminado el proceso de germinación se somete a tostación y desgerminación, que como su nombre lo indica consiste en quitar las raicillas que se han formado durante la germinación. Limpio el grano se almacena en silos.

ELABORACION DE LA CERVEZA:

Después de terminar la elaboración de la malta, ésta debe permanecer en silos almacenados cuatro semanas antes de la elaboración de cerveza para conseguir uniformidad en la humedad y estabilizar los cambios que ocurren en el grano durante el maltaje. La malta se debe moler para efectuar la extracción de sus componentes por medio de agua.

Para la elaboración del mosto se consideran cuatro etapas: maceración, filtración, ebullición del mosto y sedimentación.

La maceración consiste en extraer con agua de las materias primas (malta y adjuntos) todos los compuestos solubles, observando temperaturas y tiempos necesarios y apropiados. Esta parte de materiales y agua se conoce con el nombre de masa, el líquido resultante de la filtración se llama mosto y la parte soluble se denomina extracto.

Después del proceso de maceración, toda la materia soluble que fue extraída de la malta y de los adjuntos debe separarse de la parte insoluble (afrechos) mediante filtración.

El mosto procedente de la filtración, se lleva a la olla de cocción. En ella se dosifica el lúpulo al mosto. Una vez terminada la ebullición del mosto, éste se envía a un tanque que de sedimentación llamado "Whirpool", en el fondo del tanque se deposita un cúmulo compacto llamado "trub", que está formado por sustancias insolubles de naturaleza proteica.

Separadas las sustancias insolubles el mosto se bombea a un intercambiador de calor de placas paralelas en el cual se reduce la temperatura hasta la indicada para iniciar el proceso de fermentación. A la salida del intercambiador, al mosto se le inyecta aire. Es necesario purificar este aire mediante filtración y esterilización con luz ultravioleta.

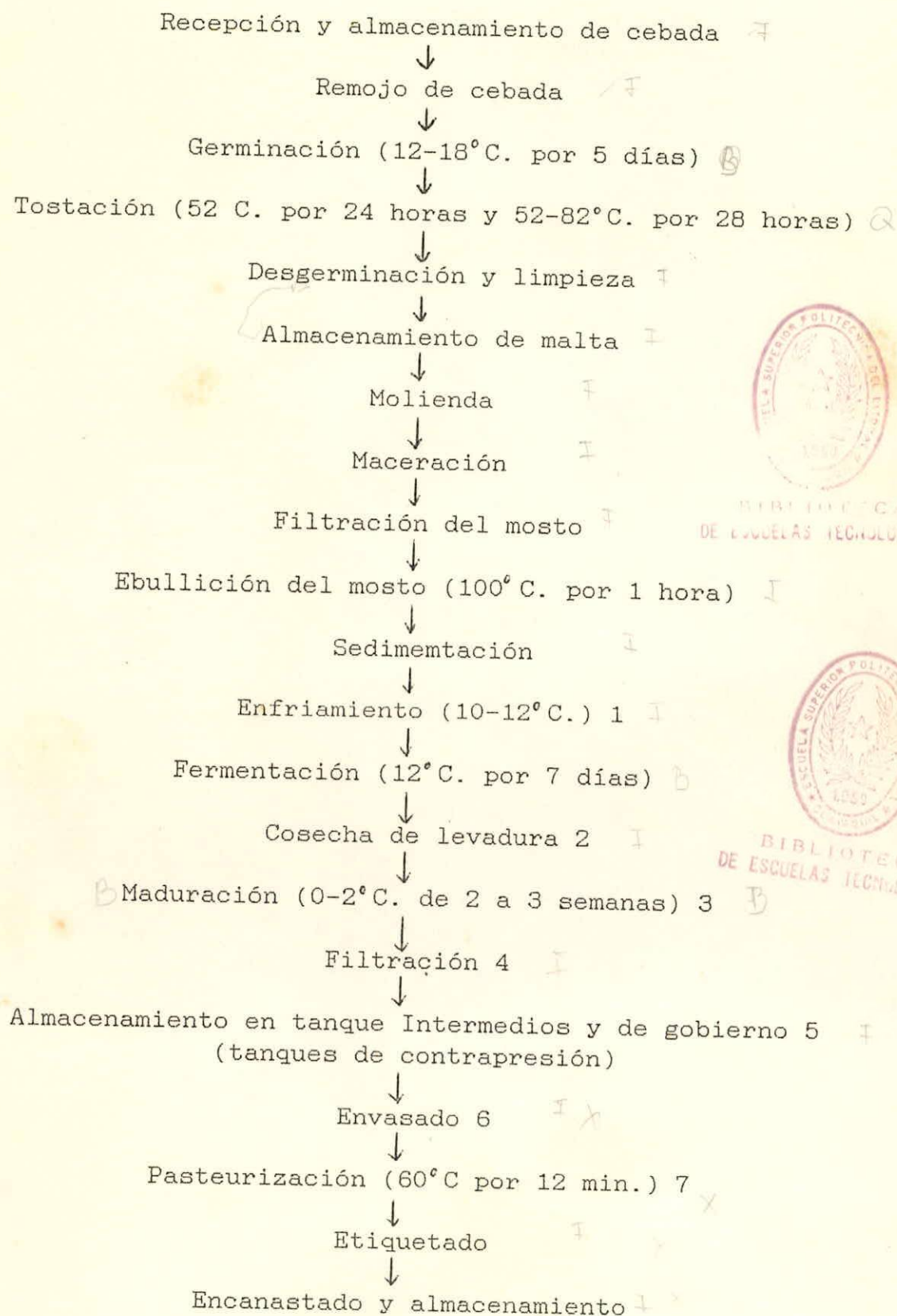
Una vez terminada esta etapa, la cual dura aproximadamente siete días obtendremos cerveza. La levadura separada por enfriamiento de ésta, sedimenta y se recoge para posteriores agregaciones. El gas carbónico producido durante el proceso de fermentación se recoge y envía a una planta de purificación, se licua por compresión y se deposita en tanques de alta presión y luego, después de gasificarlo nuevamente, se le inyecta a la cerveza para carbonatarla.

La maduración consiste en dejar la cerveza de dos a tres semanas en reposo a temperaturas frías. Terminada la maduración la cerveza posee todas las cualidades y características organolépticas deseables y la apariencia ligeramente turbia que posee debe eliminarse por medio de la filtración, utilizando filtros a presión y como medio filtrante, tierra diatomácea.

La cerveza que proviene de los tanques de maduración, se enfría, se carbonata, se filtra y se lleva a los tanques de contrapresión (tanques de gobierno) y de allí pasa al salón de embotellado para ser envasada. La cerveza que aún no ha sido pasteurizada se denomina cerveza de barril o "Chop".

La cerveza filtrada y carbonatada se lleva a la etapa de envase que como su nombre lo indica, consiste en envasar la cerveza en recipientes adecuados como son barriles de acero inoxidable y botellas de vidrio retornables y no retornables de diferentes capacidades. Comprende las siguientes secciones: Lavado y enjuague de botellas, inspección de botellas, llenado y tapado, pasteurización, etiquetado, encanastado y almacenamiento. La pasteurización asegura la estabilidad microbiológica de la cerveza por medio de un tratamiento térmico.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

DESCRIPCION DE LOS PUNTOS DE CONTROL

PUNTO DE CONTROL:

1. Mosto frío

Análisis: Estabilidad biológica a las 48 horas
Frecuencia: 2 muestras por día
Parámetros: Presencia de fermentación o turbidez = Deficiente
Objetivo: Determinar la estabilidad del mosto en condiciones controladas

PUNTO DE CONTROL:

2. Levadura

Análisis: Recuento de bacterias en 1500 células de levadura mediante el microscopio.
Frecuencia: Una vez por semana y por cosecha
Parámetros: Pediococos = 0
Bastones: Bueno = 0-5
Aceptable = 6-18
Deficiente = 18
Morfología = uniforme
Objetivo: Detectar el grado de contaminación bacteriana en la levadura de cosecha y determinar si está apta para ser utilizada en una fermentación posterior.

Análisis: Porcentaje de células
Frecuencia: Una vez por semana y por cosecha
Parámetros: Máximo un 10% de células muertas
Objetivo: Detectar el grado de viabilidad de la levadura de cosecha y determinar si está apta para ser utilizada en una fermentación posterior.

Análisis: Determinar el porcentaje de células de respiración deficiente.
Frecuencia: Una vez por semana y por cosecha
Parámetros: Máximo un 10% de células de respiración deficiente
Objetivo: Detectar el grado de viabilidad de la levadura de cosecha y determinar si está apta para ser utilizada en una fermentación posterior.

PUNTO DE CONTROL:

1. Mosto frío, 3. Cerveza en Maduración, 4. Cerveza del filtro, 5. Cerveza filtrada y almacenada, 6. Cerveza embotellada, 7. Cerveza pasteurizada

Análisis:	Inoculación microbiológica		
Frecuencia:	Una vez por semana		
Parámetros:	Medios de Cultivo:	SDA	Laurilsulfato-Verde
			Bilis
	Bueno	: 0	Producción gas (-)
	Aceptable	: 5-25	
	Deficiente:	25	Producción gas (+)
Objetivo:	Detectar la presencia de microorganismos dañinos para la cerveza mediante los medios SDA, laurilsulfato y verde bilis.		

PUNTO DE CONTROL: 8. Agua tratada

Análisis:	Inoculación microbiológica		
Frecuencia:	Una vez por semana		
Parámetros:	Medios de Cultivo:	Plate Count	SDA aerobio
		Agar Mosto	y anaerobio
	Bueno :	0-20	0
	Aceptable :	20-120	5-25
	Deficiente:	120	25
Objetivo:	Detectar la presencia de microorganismos y confirmar si se encuentra bajo parámetros.		

PUNTO DE CONTROL: 9. Tanques de fermentación y maduración, barriles para sifón y equipos

Análisis:	Revisión y observación con frotis
Frecuencia:	Después de cada aseo y un número de muestras representativo según el número de barriles aseados
Parámetros:	Bastones = 0 Pediococos = 0 Levadura salvaje = 0 Levadura de proceso = 0
Objetivo:	Supervisión de las condiciones higiénicas de los tanques, barriles y equipos después del aseo de los mismos.



RECUESTO DE GERMEENES AEROBIOS TOTALES

FUNDAMENTO: El conteaje de bacterias viables se basa comunmente en el número de colonias que se desarrollan en agar nutritivo que ha sido inoculado con cantidades conocidas del alimento y luego incubado bajo condiciones ambientales específicas.

MATERIALES: Cajas petri de vidrio
Pipetas de 10 y 5 ml.

EQUIPOS: Incubador (35° C.)
Contador de Colonias

REACTIVO: Agar Plate Count

PREPARACION DE LOS MATERIALES DE VIDRIO (CAJAS PETRI Y PIPE-TAS:

Los materiales de vidrio convenientemente lavados y enjuagados con agua destilada, deberán ser esterilizados. El método consiste en colocar los materiales envueltos previamente en papel kraft (o de despacho) en el autoclave por un hora a la temperatura de 121 C..

PROCEDIMIENTO:

La siembra de la muestra se realiza de la siguiente manera:

- a. Destapar la muestra y cerca de la llama colocarle una pipeta graduada estéril.
- b. Colocar 1 ml. de la muestra en una caja Petri previamente esterilizada.
- c. Tapar inmediatamente la caja.
- d. Añadir los medios de cultivo correspondiente a una temperatura de 40° C. aproximadamente unos 10-12ml..
- e. Tapar rápidamente la caja Petri.
- f. Agitar suavemente la caja a fin de distribuir uniformemente la muestra en el medio de cultivo.
- g. Dejar solidificar manteniendo siempre las cajas tapadas.
- h. Incubar a 35° C..
- i. Leer a las 48 horas.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Se cuenta el número de colonias desarrolladas en el agar y se reporta el número de colonias por mililitro. Interpretación de los resultados:

0-20	colonias por mililitro	=	Bueno
20-120	colonias por mililitro	=	Aceptable
Mayor 120	colonias por mililitro	=	Deficiente

NOTAS A CONSIDERAR:

1. También se acostumbra hacer siembras en superficie para lo cual previamente colocamos en cajas Petri estériles aproximadamente 12 - 15 ml. del medio, dejamos enfriar y hacemos pruebas de esterilidad (incubar 12 horas a 35° C) y sembramos sobre la superficie en estrias o rayados.
2. El tiempo transcurrido desde la inoculación de la muestra hasta la adición del agar no debe exceder a los 20 minutos.



DIRECCIÓN GENERAL
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

DETERMINACION DE LA POBLACION BACTERIANA EN LEVADURA

FUNDAMENTO: Conteo directo de bacterias en un campo visual de 100 células de levadura usando el microscopio.

MATERIALES: Beaker de 100 ml.
Asa de Platino
Lámina porta-objeto
Lámina cubre-objeto

EQUIPOS: Microscopio

REACTIVOS: NaOH 0.1N.

TOMA DE MUESTRA:

- a. Para la observación microscópica en el Laboratorio de la Cervecería se toman aproximadamente 30 ml. de levadura de un maletín o tanque, en un beaker limpio y seco, se tapa y se identifica la muestra. La toma de muestra debe hacerse en condiciones estériles (limpieza de la válvula del maletín o tanque y mechero al momento de la toma de muestra).
- b. Una vez obtenida la muestra se debe identificar en la siguiente forma, anotando:
 - 1.- Clase de levadura
 - 2.- Número de la cosecha, la cual suele expresarse con un subíndice después de la letra.
 - 3.- Número del tanque del cual se toma la muestra.
 - 4.- Fecha de la toma de muestra.

PROCEDIMIENTO:

- a. Se coloca la muestra sobre una lámina porta-objeto en la cual se ha colocado una gota de NaOH 0.1 N. usando el asa de platino.
- b. Se mezcla cuidadosamente hasta formar una suspensión uniforme. Colocar una laminilla de vidrio o cubre-objeto sobre la suspensión de levadura.
- c. Se seca con papel secante la suspensión sobrante y observar al microscopio.

La preparación de la placa se debe hacer de tal modo que en cada campo visual al microscopio queden aproximadamente 100 células de levadura distribuidas uniformemente. La observación de la muestra se realiza en 15 campos visuales diferentes, utilizando los aumentos correspondientes de 450X y 30X, con los cuales se logra un aumento apropiado de la imagen notando lo siguiente:

Uniformidad de la muestra: Esto incluye el tamaño, forma, pared celular y aspecto de la célula de levadura.
Presencia de materia amorfa, cristales o materiales extraños.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Se han establecido las siguientes normas:

Hasta 5 bastones por campo	Buena
De 6 a 18 bastones por campo	Aceptable
Más de 18 bastones por campo	Deficiente
Presencia de levadura salvaje	Deficiente

Las levaduras deben presentar condiciones normales de olor, forma, tamaño y pared celular.

NOTAS A CONSIDERAR:

La placa debe prepararse de tal manera que en cada campo visual queden aproximadamente 100 células de levadura uniformemente distribuidas, lo que se logra con la práctica.

La levadura buena puede utilizarse en nuevas fermentaciones.

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE CELULAS MUERTAS EN LEVADURA

FUNDAMENTO: Conteo directo de las células muertas de levadura en un campo visual de 100 células usando azul de metileno como indicador.

MATERIALES: Asa de platino
Lámina porta-objeto
Lámina cubre-objeto

EQUIPOS: Microscopio

REACTIVO: Solución de azul de metileno (0,010%)

PROCEDIMIENTO:

Preparar una suspensión de levadura en solución acuosa de azul de metileno, de 1:10.000 (0.010 grs. de azul de metileno en 100 ml. de agua destilada).

- a. Se coloca una gota de solución acuosa de azul de metileno sobre el porta-objetos.
- b. Con el asa de platino se agita la muestra de levadura que se tiene en el recipiente y se esparce una gota de la misma sobre el azul de metileno en la lámina de vidrio, hasta formar una suspensión uniforme.
- c. Sobre la suspensión de levadura se coloca una lámina de vidrio (cubre-objeto), se secan los bordes con papel secante y se observa al microscopio con aumento de 450X y 630X. No deben quedar burbujas de aire atrapadas.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Se hace el recuento de 100 células en tres campos diferentes. Se anota el número de las que se colorean de azul, las cuales se consideran muertas. El resultado se reporta en porcentaje de células muertas. Se considera normal una levadura que contiene hasta un 10% de células muertas.

NOTAS A CONSIDERAR:

1. La placa debe prepararse de tal manera que en cada campo visual queden aproximadamente 100 células de levadura uniformemente distribuidas, lo que se logra con la práctica.

2. Se observa al microscopio entre uno y cinco minutos después de haber puesto la levadura en contacto con el colorante para que las células muertas alcancen a teñirse.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

TECNICA PARA LA IDENTIFICACION DE CELULAS DE RESPIRACION DEFICIENTE EN LEVADURAS:

FUNDAMENTO: Detección de células de levadura de respiración deficiente en una población dada por una técnica de recubrimiento con trifeniltetrazolium cloruro (TTC) como indicador.

La 2,3,5 trifeniltetrazolium cloruro es una sal incolora que forma un precipitado rojo al reducirse. Cuando se cubren las colonias de levadura, los organismos de respiración reducen el TTC, las colonias toman un color rosado obscuro. De otra forma los organismos de respiración deficiente no reducen el tinte y retienen su color original usualmente blanco.

MATERIALES: Cajas Petri
Pipetas
Balones de 1000 ml.

EQUIPOS: Contador de colonias
Incubador aeróbico 28-30°C.
Cabina de flujo laminar

REACTIVOS: Medio YPD (Yeast Pepton Dextrosa)
Trifeniltetrazolium Cloruro (TTC) sobre agar

PREPARACION DE LA MUESTRA:

La suspensión de levadura debe diluirse hasta obtener una solución con una concentración de 500-1000 células por mililitro.

PROCEDIMIENTO:

- a. Una vez preparado el Medio YPD y enfriado a 45° C. se procede a colocar de 10 a 15 ml. del mismo en las cajas petri previamente esterilizadas.
- b. Esperar a que solidifique el medio.
- c. Cuando el medio esté sólido inocule 0.1 ml. de la muestra en las cajas y con la pipeta extienda la misma sobre el agar cuidando de no romperlo.
- d. Las cajas son incubadas por 3 días a 28-30°C. en condiciones aeróbicas, al cabo de los cuales se hace el conteo de las colonias desarrolladas.

- e. Cada caja se cubre con 20 ml. de TTC sobre agar a 50°C.
- f. Después de una incubación adicional de 3 horas a temperatura ambiente, las colonias son observadas.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Las colonias blancas son consideradas de respiración deficiente. Se reporta el porcentaje de las mismas.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

DETERMINACION DE COLIFORMES EN AGUA Y CERVEZA

FUNDAMENTO: La determinación de coliformes se fundamenta en la capacidad que presentan estos microorganismos de fermentar la lactosa con producción de gas.

MATERIALES: Tubos de ensayo
Pipetas

EQUIPOS: Incubador a 35°C.

REACTIVOS: Caldo Lauril-sulfato
Caldo Verde Bilis

PROCEDIMIENTO:

- a. Colocar 2 ml de la muestra en tubos previamente preparados con 10-12 ml. de caldo Lauril-sulfato y la campana de Durham.
- b. Tapar los tubos.
- c. Incubar a 35°C. por 48 horas.
- d. Realizar la lectura. Si no hay producción de gas se considera negativo. Si hay producción de gas, se procede a hacer el análisis confirmativo con 10 ml. de caldo Verde Bilis brillante.
- e. Se coloca una gota del cultivo positivo, se incuba 48 horas a 35°C..
- f. Realizar la lectura.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Si hay producción de gas en la prueba confirmativa se considera positivo. Toda muestra que de resultados positivos en este análisis se considera deficiente.

NOTAS A CONSIDERAR:

1. Los medios más útiles son los que contienen bilis, que inhibe la mayor parte de los cocos y de los bacilos Gram (+).
2. La presencia de lactosa y la utilización del tubo Durham como indicador en el medio permite reconocer fácilmente a los bacilos coliformes.

3. La utilización del caldo Lauril-sulfato permite aislar los microorganismos fermentadores de lactosa con producción de gas para luego poder hacer la prueba confirmativa de coliformes en el medio Verde Bilis.

NUMERO MAS PROBABLE (MPN)

Es un técnica utilizada para determinar el grado de contaminación de aguas y otras bebidas con coliformes. En la Compañía de Cervezas Nacionales C.A. se realiza esta prueba exclusivamente para el agua de las cisternas.

FUNDAMENTO: La determinación e coliformes se fundamenta en la capacidad que presentan estos microorganismos de fermentar la lactosa con producción de gas.

MATERIALES: Tubos de ensayo
Pipetas

EQUIPOS: Incubador a 35°C.

REACTIVOS: Caldo Lauril-sulfato
Caldo Verde Bilis

PROCEDIMIENTO:

- En dos tubos de concentración sencilla de Caldo Lauril-sulfato, añadir 1 ml. de muestra a un tubo y 0,1 en el otro tubo.
- En cinco tubos de doble concentración del mismo medio, añadir a cada uno 10 ml. de la muestra.
- Incubar a 35°C. durante 48 horas. Si no hay producción de gas se considera negativo. Si hay producción de gas, se procede a hacer el análisis confirmativo con 10 ml. de Caldo Verde Bilis Brillante.
- Se coloca una gota del cultivo positivo, se incuba durante 48 horas a 35°C..

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Si no hay producción de gas en la prueba confirmativa se considera negativo. Si hay producción de gas, se considera positivo. Las muestras positivas son deficientes.

NOTA A CONSIDERAR:

ES conveniente expresar el resultado de los exámenes en términos del número más probable (MPN). Este término es actualmente estimativo basado en ciertas fórmulas probables. Según la cantidad de tubos que hayan dado resultados positivos al hacer la confirmación, se compara con la tabla anexa y se reporta.



SUPERVISION DE ASEOS MEDIANTE FROTIS

La supervisión de las condiciones higiénicas de las líneas de envase, tanques de maduración y fermentación, y barriles de cerveza, ayudan en gran manera a detectar las posibles fuentes de contaminación del producto durante el proceso, de allí la importancia de realizar un frotis para la determinación del grado de limpieza de las mismas.

FUNDAMENTO: Observación al microscopio de la muestra tomada con hisopos estériles en los equipos recién desinfectados.

MATERIALES: Hisopos estériles
Láminas porta-objeto
Láminas cubre-objeto

EQUIPOS: Microscopio

REACTIVOS: NaOH 0.1 N.

PROCEDIMIENTO:

- Se coloca sobre la lámina cubre-objeto el hisopo con la muestra y se deja caer 2 o 3 gotas de NaOH 0.1 N. sobre el hisopo.
- Se mezcla cuidadosamente, procurando que la muestra se distribuya uniformemente sobre la placa.
- Se coloca una laminilla de vidrio o cubre-objeto sobre la suspensión formando cuidando que no queden burbujas de aire atrapadas entre la lámina y laminilla.
- Se seca con papel absorbente la suspensión sobrante.
- Se observa al microscopio.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

Se observa la totalidad de la placa determinando la presencia de microorganismos y materia amorfa. Para que las condiciones higiénicas sean consideradas buenas debe observarse poca materia amorfa y cumplir con los siguientes parámetros:

Bastones	= 0
Pediococos	= 0
Levadura salvaje	= 0
Levadura proceso	= 0

La presencia de microorganismos y excesiva cantidad de materia amorfa determina condiciones higiénicas deficientes.

NOTA A CONSIDERAR:

1. La supervisión de aseos mediante frotis se complementa con la prueba de fenolftaleína para determinar la presencia de soda.



PROPAGACION DEL CULTIVO PURO DE LEVADURA

La introducción de sistemas de propagación de cultivos de levadura pura en el proceso cervecero ha proporcionado al maestro cervecero una herramienta valiosa, ya que le permite propagar grandes cantidades de levadura bajo condiciones cuidadosamente controladas, libre de contaminantes.

FUNDAMENTO: Reproducción de un cultivo puro de levadura bajo condiciones controladas y apropiadas para la obtención del cultivo iniciador de fermentación en el proceso.

MATERIALES: Fermentador de 1000 y 3000 ml.
Barril de acero

EQUIPOS: Tanques propagadores de 50 y 200 hectolitros

REACTIVOS: Mosto estéril y filtrado

PREPARACION DEL MOSTO:

- Se toma aproximadamente 2500 ml. del mosto procedente de los enfriadores y se lo esteriliza en el autoclave a 100 grados centígrados por 30 minutos.
- Enfriar y almacenar a 10°C. por 24 horas para que precipiten las impurezas.
- Filtrar a través de un lecho de algodón.
- Colocar 350 ml. y 1500 ml del mosto filtrado en los fermentadores de 1000 y 3000 ml. respectivamente.
- Esterilizar en el autoclave a 100°C. por 30 minutos.

PROCEDIMIENTO:

- Se toma 150 ml. del cultivo puro de levadura y se lo agrega al fermentador que debe contener 350 ml. del mosto filtrado y estéril, de manera que alcance un volumen de 500 ml..
- Se incuba a 10°C..
- A las 24 horas de la primera agregación se procede a traspasar la levadura al segundo fermentador que debe contener 1500 ml. de mosto filtrado y estéril, de modo que llegue a un volumen de 2000 ml. y se incuba a 10°C.
- Después de 24 horas de incubación se procede a llevar el agregado de levadura a la planta de la fábrica para su traspaso al barril de acero previamente desinfectado.

- e. Se adiciona mosto frío y aireado procedente de los enfriadores al barril de acero de modo que se lleve a la suspensión de levadura a un volumen de 5 litros y posteriormente a las 24 horas a 20 litros. Se coloca el barril en la bodega de frío a 12°C..
- f. A las 24 horas de incubación después de la segunda agregación de mosto se traspasa el contenido del barril al tanque propagador de 50 hectolitros (Hl) y se lleva la suspensión a 1 Hl. con el mosto procedente de los enfriadores.
- g. Se procede a agregar mosto cada 24 horas hasta llevar la suspensión de levadura a los volúmenes de 5, 20 y 50 Hl..
- h. Mediante mangueras desinfectadas se traspasa el contenido del propagador de 50 Hl. al propagador de 200 Hl., en donde se agrega mosto hasta que alcance dicho volumen. Se incuba por 48 horas a 12°C..

RESULTADOS:

Una vez efectuada la última incubación, se obtiene el cultivo iniciador de fermentación que se pone a disposición del maestro cervecero para su uso en el proceso.

NOTAS A CONSIDERAR:

- 1. Los equipos que se utilizan en la Planta para la propagación deben estar escrupulosamente limpios y desinfectados.
- 2. El cultivo puro de levadura procede de la Cervecería de Babaria-Colombia.

DETERMINACION DE LA ESTABILIDAD MICROBIOLOGICA DEL MOSTO

FUNDAMENTO: Incubación de la muestra a 25°C. durante 48 horas.

MATERIALES: Botella estéril
Pinzas
Algodón

EQUIPOS: Incubador a 25°C.

TOMA DE MUESTRA:

Se deben tomar muestras de cada cocimiento de mosto después de enfriado y aireado. Las instrucciones a seguir son:

1. El grifo de toma de muestra se debe limpiar previamente con agua, luego con alcohol y algodón se desinfecta, y se calienta 3 minutos aproximadamente con una llama.
2. Se abre el grifo y se deja correr el mosto que está en zona cercana.
3. En un frasco estéril se toma la muestra del mosto, para ello se debe tener aire caliente alrededor, esto se consigue prendiendo un algodón impregnado en alcohol y sostenido con unas pinzas.
4. Una vez obtenida la cantidad necesaria de líquido cerrar el frasco con el tapón de algodón original.

PROCEDIMIENTO:

1. Identificar la muestra con el número de cocimiento.
2. Se incuba el frasco a 25°C. durante 48 horas, al terminar este tiempo se determina la estabilidad del mosto.

INTERPRETACION DE RESULTADOS:

Si se observa fermentación (que se determina mediante agitación de la muestra incubada y formación de espuma en la misma) o turbidez nos indica que la estabilidad es deficiente.

CALCULO DE LA CONCENTRACION DE CELULAS DE LEVADURA

FUNDAMENTO: Cálculo de la concentración de células de levadura presente en una muestra mediante el conteo directo de células usando la cámara Neubauer y el microscopio.

MATERIALES: Cámara Neubauer
Tubos de ensayo
Pipeta pasteur
Piceta

EQUIPOS: Microscopio

REACTIVOS: Agua destilada

PREPARACION DE LA MUESTRA:

La muestra debe ser desgasificada mediante agitación y diluirse tomando un mililitro y llevarlo a 20 con agua destilada. El factor de dilución debe usarse en el cálculo.

PROCEDIMIENTO:

- a. Llenado de la cámara: Debido a que el área de conteo y la posición correcta de la laminilla determinan el volumen sobre el área de conteo es extremadamente importante llenar la cámara correctamente. La laminilla debe ir centrada sobre el área de conteo. Se toma una pipeta limpia y seca la muestra, se deja caer unas 3 o 4 gotas, permitir luego que una pequeña gota de muestra fluya entre la cámara y la laminilla. El área debe quedar completamente llena sin que se extienda el líquido sobre las fosas o canales. Dejar reposar por unos pocos minutos para que las células sedimenten.
- b. Conteo: El conteo de las células debe realizarse dentro del área de 1 mm, deben contarse todas las células de levadura que se encuentran dentro de dicha área. Para evitar contar algunas células dos veces es necesario standarizar la técnica de conteo.



La cuadrícula central mide 1 mm. por cada lado con un área total de 1 mm .. Cada uno de los 25 cuadros en los que está dividida la cuadrícula central mide 0.2 mm. con un área de 0.02 mm .. La profundidad del área de conteo es determinada por la laminilla cobre-objeto, usualmente es de 0.1 ml. por encima del área de conteo.

El volumen del líquido sobre la cuadrícula puede ser calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{VOLUMEN} = \text{LARGO} \times \text{ANCHO} \times \text{ALTURA}$$

donde:

Largo = 1 mm

Ancho = 1 mm

Altura = 0.1 mm

$$\text{Volumen} = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm} \cdot \text{o } 1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$$

El conteo de las células de levaduras obtenidas no debe ser menor de 5 células en el área de 1 mm. y no mayor de 48 células en uno de los 25 cuadros. El conteo de ambos lados de la cámara debe coincidir dentro de un 10%.

c. Standarización del conteo: Las células que tocan las líneas superior y derecha de la cuadrícula no se cuentan, las células que tocan las líneas inferior e izquierda de la cuadrícula si se cuentan.

Las células que se encuentran en gemación se cuentan como una sola célula si la gema es la mitad del tamaño de la célula madre, si la gema es igual que la célula madre se cuentan las dos células.

CALCULO:

$$\begin{aligned} \text{Número de Células por ml.} &= \frac{\text{Total de células del área de los} \\ &\quad 25 \text{ cuadros} \times \text{factor de dilución}}{\text{X volumen tomado}} \end{aligned}$$

EJEMPLO:

Lectura de dos áreas de conteo: 20 y 22 células

$$\begin{aligned} \text{Número de células por ml} &= \frac{21 \times 20 \times (1 \times 10^{-4})}{4 \times 200.000} \end{aligned}$$

NOTAS A CONSIDERAR:

1. La cámara de Neubauer, usada para el conteo de células, es una pieza hecha de vidrio resistente con dos áreas de conteo de dos cuadros separados cada uno en tres lados por una fosa.

2. Este método no distingue entre células vivas o no.
3. Este método no es útil para soluciones que contengan menos de 500.000 células de levadura por mililitro.

RECUESTO DE GERMEENES PERJUDICIALES PARA LA CERVEZA

FUNDAMENTO: El conteje de bacterias viables perjudiciales para la cerveza se basa comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en agar SDA (Schwarz Differential Agar) que ha sido inoculado con cantidades conocidas de muestra y luego incubado bajo condiciones específicas.

El agar SDA es una combinación de cerveza y sustratos especiales el cual promueve particularmente el crecimiento de bacterias dañinas a la cerveza (Lactobilos, Pediococos) y al mismo tiempo inhibe el crecimiento de bacterias no dañinas a la cerveza. Con la adición de la actidiona se inhibe el crecimiento de levaduras.

MATERIALES: Cajas petri de vidrio
Pipetas de 10 y 5 ml.

EQUIPOS: Incubador a 30°C.
Contador de colonias

REACTIVOS: Agar SDA (Schwarz Differential Agar)
Actidiona



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

PREPARACION DE LA CAJA PETRI:

- Una vez preparado el medio SDA y enfriado a 45°C. suspender el CaCO_3 presente en el medio agitando, evitando la formación de excesiva espuma.
- Adicionar aproximadamente 12-15 ml. del medio en las cajas petri previamente esterilizadas y dejar solidificar el medio.
- Luego que el medio ha solidificado colocar las cajas invertidas en una incubadora a 30°C. para que se sequen durante una noche, el secado excesivo debe ser evitado.
- Almacenar las cajas en posición invertida a 1-5°C. antes que se requieran para el uso.

PROCEDIMIENTO:

La siembra de muestra se realiza de la siguiente manera:

- Destapar la muestra cerca de la llama y colocarle una pipeta graduada estéril.
- Colocar 0.2 ml. de la muestra en una caja petri

- previamente preparada con agar SDA.
- c. Distribuir la muestra sobre la superficie del agar con la pipeta cuidando de no romper el agar.
 - d. Incubar a 30°C. por 5 días.
 - e. Realizar la lectura.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Se cuenta el número de colonias desarrolladas en el agar, se multiplica por el factor de dilución (5) y se reporta el número de colonias por mililitro. Interpretación de los resultados:

0	colonias	=	Bueno
5-25	colonias	=	Aceptable
25	colonias	=	Deficiente

NOTAS A CONSIDERAR:

1. El medio favorece el crecimiento de levaduras y bacterias para suprimir el crecimiento de la levadura, es necesario adicionar actidiona en una concentración de 1 ml. por cada 100 del medio en la preparación del mismo.
2. La actidiona se adiciona solo en el medio destinado para determinar bacterias anaerobias.
3. Se determinan las bacterias anaerobias solo en cerveza; en agua y mosto frío se determinan bacterias aerobias y anaerobias.
4. Para determinar bacterias anaerobias se incuba la caja inoculada en jarras anaerobias utilizando el sistema Gaspack para lograr las condiciones deseadas.
5. El medio SDA es termolábil y no debe ser fundido, si se solidificó es mejor desecharlo.

RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS EN AGUA

FUNDAMENTO: El conteo de mohos y levaduras se basa comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en agar Mosto que ha sido inoculado con cantidades conocidas de la muestra y luego incubado bajo condiciones ambientales específicas.

El agar Mosto tiene un pH de 5.0, en el cual la flora bacteriana de acompañamiento es inhibida, permitiendo el cultivo, asilamiento y numeración de hongos, especialmente de levaduras.

MATERIALES: Cajas petri de vidrio
Pipetas de 10 y 5 ml

EQUIPOS: Incubador a 35°C.
Contador de Colonias

REACTIVO: Agar Mosto

PROCEDIMIENTO:

La siembra de la muestra se realiza de la siguiente manera:

- Destapar la muestra y cerca de la llama colocarle una pipeta graduada estéril.
- Colocar 1 ml. de la muestra en una caja petri previamente esterilizada.
- Tapar inmediatamente la caja.
- Añadir el medio de cultivo correspondiente a una temperatura de 40°C. aproximadamente unos 10-12 ml..
- Tapar rápidamente la caja petri.
- Agitar suavemente la caja a fin de distribuir uniformemente la muestra en el medio de cultivo.
- Dejar solidificar manteniendo siempre las cajas tapadas.
- Incubar a 35°C..
- Leer a los 5 días.

EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Se cuenta el número de colonias desarrolladas en el agar y se reporta el número de colonias por mililitro. Interpretación de los resultados:

0 - 20 colonias por ml.	= Buena
20 - 120 colonias por ml.	= Aceptable
120 colonias por ml.	= Deficiente



NOTA A CONSIDERAR:

1. El tiempo transcurrido desde la inoculación de la muestra hasta la adición del agar no debe exceder a los 20 minutos.

ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

UBICACION:

La Compañía de Cervezas Nacionales C.A. se encuentra ubicada en la Ciudad de Guayaquil en el Km. 16,5 vía Daule.

TAMANO FISICO:

Las dimensiones de la planta cervecera son las siguientes:

Area del terreno:	107.702 m2
Areas de construcción:	
Area industrial:	25.200 m2
Edificio administrativo:	5.380 m2
Silos:	31.800 m2
Vestidores:	1.000 m2
Parqueaderos:	340 m2

TAMANO DE PRODUCCION:

La Cervecería Nacional produce alrededor de 1000 pallets diarios de cerveza, cada pallet contiene 72 jabs por lo tanto son 72.000 jabs producidas en los 3 turnos de trabajo del día. Se labora de lunes a sábado y algunas ocasiones los domingos. Del total producido por la compañía de Cervezas Nacionales C.A. aproximadamente un 75% es de cerveza marca Pilsener y el resto marca Club. Sin embargo ocasionalmente se produce cerveza One-Way (no retornable) y agua mineral marca Manantial.

ACTIVIDADES A LAS QUE SE DEDICA LA EMPRESA:

La Compañía de Cervezas Nacionales se dedica principalmente a la fabricación de cerveza Pilsener y Club las cuales son vendidas a nivel nacional y se está comenzando a exportar a países latinoamericanos y a E.E.U.U.. Las marcas anteriormente mencionadas representan casi el 90% de sus ingresos, siendo el otro 10% producto de la venta de agua mineral "Manantial" y de los desperdicios cerveceros, principalmente afrecho (granos de malta y adjuntos residuales) y la levadura de cerveza que se la utiliza en la industria panificadora.

DISTRIBUCION:

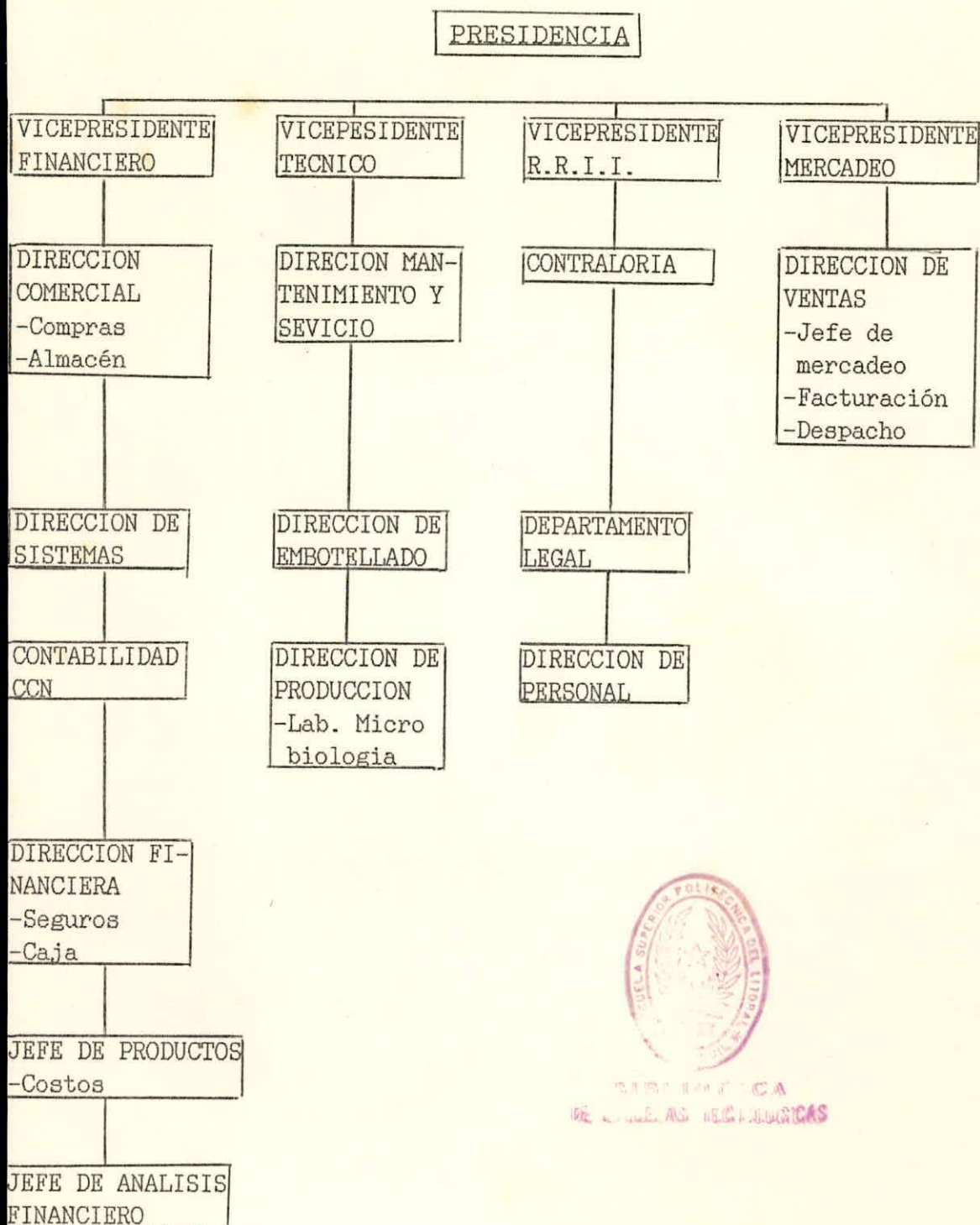
La distribución de la cerveza es realizada por personas o empresas particulares. Se despacha de lunes a sábado de 7h00 a 17h00. El pago de la cerveza se lo realiza antes de la entrega y de contado. La utilidad para los distribuidores es pequeña por jaba pero grande por volumen de ventas.

Para la distribución existen camiones para la ciudad, generalmente pequeños. Estos llevan la cerveza directamente a los bares y los transportes de provincia que generalmente son grandes trailers que llevan solo la cerveza hasta bodegas en sus respectivas ciudades, para luego ser distribuidos por camiones más pequeños. Estos camiones son diseñados de acuerdo a las exigencias de la compañía para facilitar el manipuleo de los pallets. La empresa cuenta con 8 camiones para la distribución en la ciudad y 10 para la distribución en provincias.



BIBLIOT. CA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

ORGANIGRAMA DE FUNCIONES



SECRETARÍA
DE ASUNTOS ADMINISTRATIVOS

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- • El cálculo de la concentración de células de levadura en la cerveza en maduración es una herramienta útil que nos permite predecir las condiciones en que se va a producir la filtración, de manera que el cervecero pueda tomar las medidas preventivas para evitar el taponamiento del filtro.
- • La levadura cervecera merece especial atención tanto en la propagación del cultivo puro, como de los controles que se realizan a la levadura de cosecha, ya que de la calidad de la misma depende la obtención de una cerveza de brillo y sabor apropiados.
- Debido a que el Laboratorio de Microbiología es de gran importancia en la Industria Cervecera y participa activamente en el proceso de elaboración, debe siempre mantenerse informado de las nuevas técnicas que se desarrollan para el control microbiológico y saber adaptarlas de la manera más adecuada a las condiciones de trabajo.
- • La supervisión de las condiciones higiénicas de los equipos, tanques y barriles mediante frotis nos permite determinar con rapidez las fuentes de contaminación de manera que éstas pueden ser eliminadas antes que entren en contacto con el producto.
- • Se recomienda la reubicación de ciertas llaves de toma de muestra dentro de la infraestructura de la planta de manera que brinden mayor facilidad para su desinfección asegurando la confiabilidad de los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos.
- El laboratorio de Microbiología de la Compañía de Cervezas Nacionales C.A. es ideal para realizar Prácticas Profesionales o Industriales II, ya que las personas que allí laboran se preocupan por brindar nuevos conocimientos y reforzar los ya adquiridos por el Practicante convirtiéndose en una experiencia invaluable para el desarrollo profesional.

BIBLIOGRAFIA

- CURSO DE CERVECERIA No. 41, Microbiología Cervecera, Babaria-Colombia, 1984
- AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMIST PUBLICATION, Methods of Analysis Yeast, Seventh Edition, Chilton Book Company, Pennsylvania, 1976
- THE PRACTICAL BREWER ASSOCIATION OF THE AMERICAS, Second Edition, New York, 1977

ANEXOS

ANEXO # 1

PREPARACION DE LOS REACTIVOS DE LA TECNICA PARA LA IDENTIFICACION DE CELULAS DE RESPIRACION DEFICIENTE EN LEVADURA:

a) Medio YPD:

Disolver los siguientes ingredientes en agua destilada para preparar un litro:

Extracto de levadura	10 gr.
Peptona	20 gr.
Dextrosa	20 gr.
Agar	20 gr.

Esterilizar el medio en el autoclave a 121 C. por 15 minutos.

b) Trifeniltetrazolium Cloruro (TTC) sobre agar:

Los siguientes ingredientes deben llevarse al autoclave en soluciones separadas por que el TTC es reducido cuando se lleva al autoclave en solución con agar. Las dos soluciones son mezcladas antes del uso (cuando se encuentren a una temperatura de 55 C.).

Solucion A: Buffer de fosfato de doble potencia con agar: Disolver 1.26 gr. de NaH_2PO_4 (fosfato dibásico de sodio), 1.16 gr. de Na_2HPO_4 (fosfato ácido de sodio) y 3.0 gr. de agar, completar con agua destilada hasta 100 mililitros.

Solucion B: Solución de doble potencia de TTC: Disolver 0.2 gr. de 2,3,5-trifeniltetrazolium cloruro, completar con agua destilada a 100 ml.

Llevar por separado la solución A y B al autoclave por 15 minutos a 121 C. y 21 libras de presión. Mezclar las soluciones después que estén a 55 C.



BIBLIOTECA
DE LA UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL, ECUADOR

ANEXO # 2

TABLA

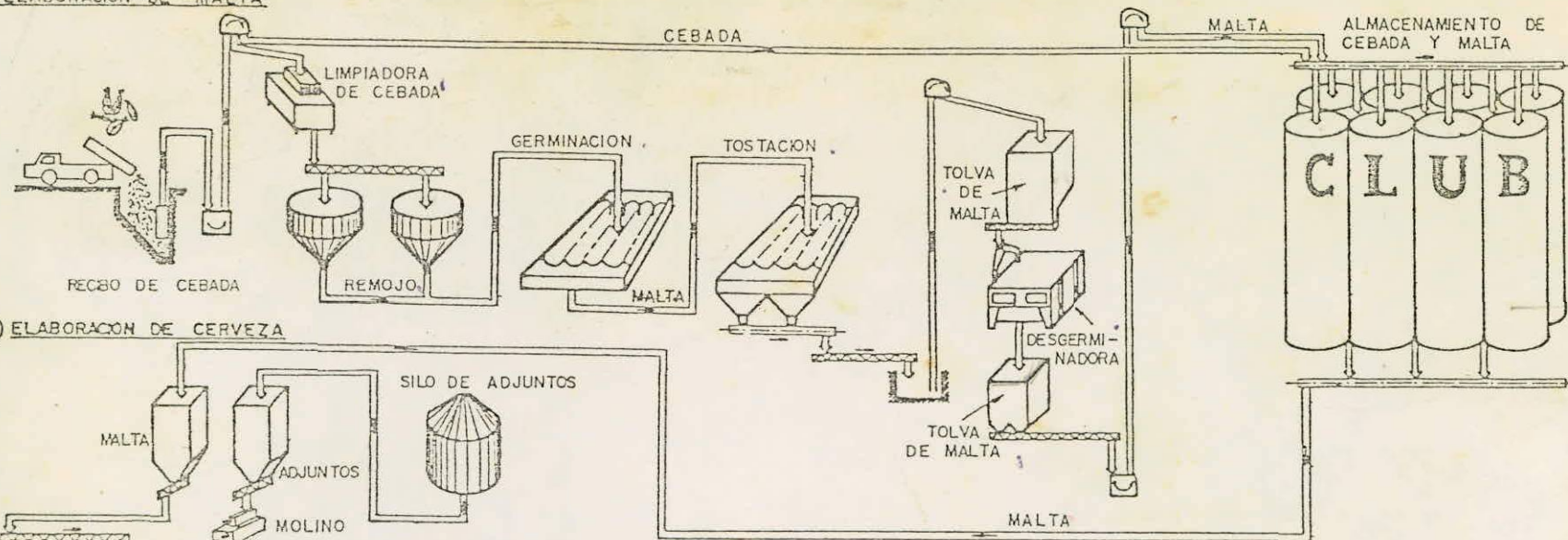
MPN - INDEX Y 95 % LIMITES DE CONFIABILIDAD PARA VARIAS COMBINACIONES DE RESULTADOS POSITIVOS Y NEGATIVOS (SIEMBRA DE 5 INOCULOS CON 10 ML., 1 INOCULO DE 0.1 ML. Y 1 INOCULO DE 1 ML.)

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS			M P N INDEX	95% LIMITE CONFIDENCIAL	
5 DE 10	1 DE 1	1 DE 0.1		BAJO	ALTO
0	0	0	2	0	5.9
0	1	0	2	0.050	13
1	0	0	2.2	0.050	13
1	1	0	4.4	0.52	14
2	0	0	5	0.54	19
2	1	0	7.6	1.5	19
3	0	0	8.8	1.6	29
3	1	0	12	3.1	30
4	0	0	15	3.3	46
4	0	1	20	5.9	48
4	1	0	21	6.0	53
5	0	0	38	6.4	330
5	0	1	96	12	370
5	1	0	240	12	3.700
5	1	1	240		

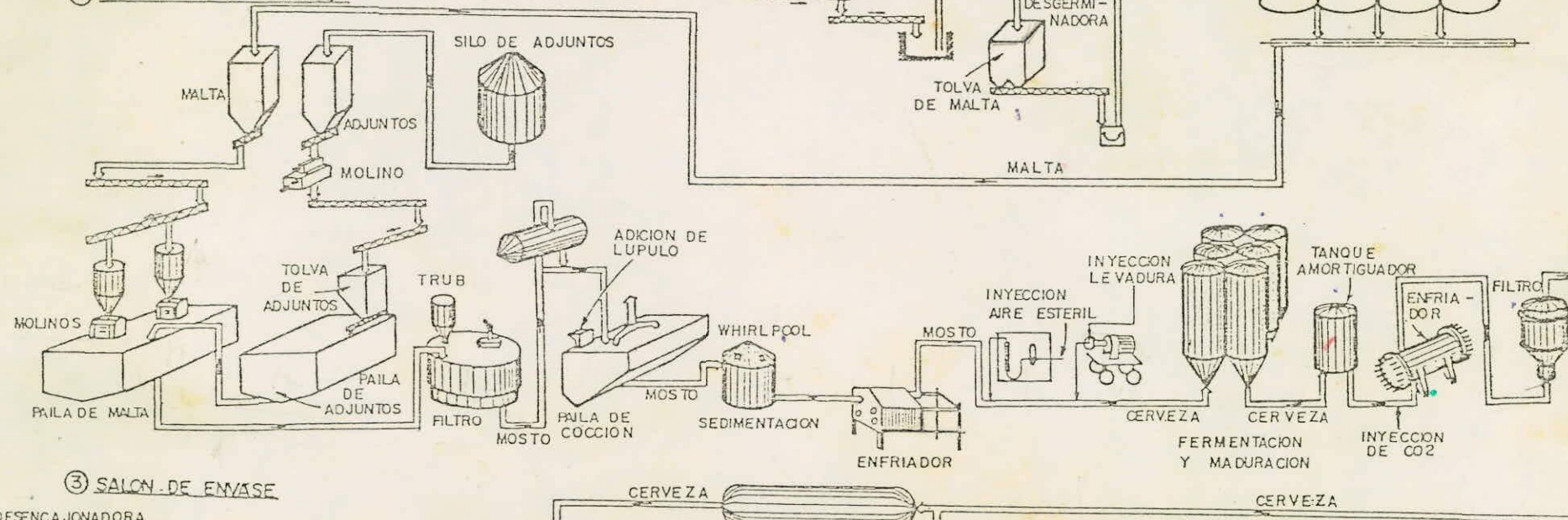


DE LABORATORIO CAS

① ELABORACION DE MALTA



② ELABORACION DE CERVEZA



③ SALON DE ENVASE

DESENCAMIONADORA

