



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA A LOS PROCESOS
DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE JORA DE
IMBABURA-ECUADOR**

**TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO DE ALIMENTOS**

HUGO ANDRÉS LÓPEZ QUIÑONEZ

DIRECTORA: ING. NUBIA GRIJALVA

Quito, Marzo, 2015

© Universidad Tecnológica Equinoccial. 2015
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo **HUGO ANDRÉS LÓPEZ QUIÑONEZ**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnológica Equinoccial puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Hugo Andrés López Quiñónez

C.I. 1003670740

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por **título “DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA A LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE JORA DE IMBABURA - ECUADOR”**, que, para aspirar al título de Ingeniero de Alimentos fue desarrollado por **Hugo López**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 18 y 25.

Nubia Grijalva
DIRECTORA DEL TRABAJO
C.I. 1717665689

DEDICATORIA

Con mucho amor, respeto y admiración dedico este trabajo a mis padres Freddy y Lucy, por el apoyo incondicional, por su inmenso amor, por los valores que han sido fundamentados en la palabra de Dios y por ser ejemplo de personas íntegras y por enseñarme a soñar y a trabajar todos los días para hacerlos realidad.

A mis hermanos Abigail y Freddy quienes son el motor de mi vida, mi inspiración y por quienes lucho cada día para ser un mejor ejemplo para ellos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por tantas bendiciones, quien con su infinito amor y bondad ha tenido cuidado de mi vida.

A mi padre Freddy Corella, quien ha sido el mejor Padre que Dios pudo bendecirme, gracias Héroe por sus enseñanzas, por su amor, su paciencia, por ser un ejemplo a seguir, no encontraría palabras para demostrar mi admiración y gratitud.

A mi hermosa Madre, gracias por tanto cariño, tanta paciencia, tanta lucha por el amor incondicional, por sus valiosas enseñanzas, y por inculcar en mí los valores de Dios, los cuales los guardaré en mi corazón por siempre.

A mi hermano Freddy Jr., gracias por ser mi amigo, por ser un gran hermano quien cada día me enseña que en la vida hay que soñar alto para llegar lejos, gracias por tu apoyo día a día.

A mí querida hermana Abigail, gracias por tu cariño, por tus cuidados, por tu amistad y por el apoyo en todo momento.

A mi gran Amigo Carlitos López +, siempre te recordaré.

A mi tutora de Tesis, Ing. Nubia Grijalva, que con paciencia y gran profesionalismo supo guiarme para el desarrollo y la culminación del presente trabajo.

A July Terán quien ha sido un pilar fundamental para cumplir esta meta en mi vida, gracias por tu inmenso cariño.

A mis amigos y compañeros, quienes hemos compartido grandes momentos, los cuales recordaré con mucho cariño, gracias por su apoyo a lo largo de mi carrera.

A la Universidad Tecnológica Equinoccial- Facultad de Ciencias de la Ingeniería – Carrera Ingeniería de Alimentos y al personal docente.

¡Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	4
2.2 BEBIDAS FERMENTADAS ECUATORIANAS	6
2.2.1 BEBIDAS FERMENTADAS POR REGIONES	6
2.2.2 BEBIDAS FERMENTADAS DE IMBABURA	8
2.2.2.1 Chicha de Jora	9
2.2.2.2 Proceso de Elaboración de Chicha de Jora	9
2.3 MICROBIOLOGÍA DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS	12
2.3.1 HONGOS	12
2.3.1.1 Importancia de los hongos en bebidas fermentadas	12
2.3.2 LEVADURAS	13
2.3.2.1 Importancia de las levaduras	14
2.3.3 BACTERIAS	15
2.3.3.1 Importancia de las bacterias	15

	PÁGINA
2.4 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	17
2.4.1 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS	17
2.4.2 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	17
2.4.3 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS	19
3. METODOLOGÍA	22
3.1 INVESTIGACIÓN DE CAMPO	22
3.2 TOMA DE LA MUESTRA	22
3.3 AISLAMIENTO PRIMARIO Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PUROS	23
3.3.1 PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS	24
3.3.2 SIEMBRA EN PLACA EN SUPERFICIE	24
3.3.3 AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS, LEVADURAS, BACTERIAS LÁCTICAS	25
3.3.4 AISLAMIENTO DE MOHOS	26
3.4 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS	26
3.4.1 TINCIÓN GRAM	26
3.5 IDENTIFICACIÓN DE MOHOS	29
3.6 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICO POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS	29
3.6.1 PRUEBA DE ANAEROBIOSIS	29
3.6.2 PRUEBA DE AEROBIOSIS	30

	PÁGINA
3.7 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 RECuentos MICROBIANOS	31
4.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	34
4.2.1 ENTEROBACTERIAS	34
4.2.2 MOHOS	36
4.2.2.1 Etapa I	36
4.2.2.2 Etapa II	37
4.2.2.3 Etapa III	38
4.2.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	39
4.2.4 LEVADURAS	42
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
5.1 CONCLUSIONES	47
5.2 RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Ejemplos de Bacterias Utilizadas Industrialmente	16
Tabla 2. Principios, Modos de Acción, y aplicaciones de algunas pruebas bioquímicas rápidas.	20
Tabla 3. Condiciones de incubación y medios de cultivo selectivos	25
Tabla 4. Identificación de enterobacterias por pruebas bioquímicas	26
Tabla 5. Recuentos microbianos	31
Tabla 6. Cepas de enterobacterias identificadas en la primera etapa de fermentación	35
Tabla 7. Mohos identificados en la primera etapa de fermentación de la bebida Chicha de Jora	37
Tabla 8. Mohos identificados en la segunda etapa de fermentación de la bebida Chicha de Jora	37
Tabla 9. Mohos identificados en la segunda etapa de fermentación de la bebida Chicha de Jora	38
Tabla 10. Identificación de bacterias ácido Lácticas en la primera etapa	39
Tabla 11. Identificación de bacterias ácido Lácticas en en la segunda etapa	40
Tabla 12. Identificación de bacterias ácido Lácticas en en la Tercera etapa	41
Tabla 13. Identificación de levaduras en en la primera etapa	43
Tabla 14. Identificación de levaduras en en la segunda etapa	43
Tabla 15. Identificación de levaduras en en la tercera etapa	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Fermentación alcohólica, ruta completa	5
Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración de la Chicha de Jora	11
Figura 3. Preparación de Chicha en las viviendas de los productores	22
Figura 4. Secuencia de siembra en placa	25
Figura 5. Tinción Gram	26
Figura 6. Kit API 20 C AUX	30

RESUMEN

En la presente investigación se realizó el análisis microbiológico de la Chicha de Jora, con muestras obtenidas de productores artesanales de esta bebida en el cantón Cotacachi (Imbabura – Ecuador). Las muestras iniciales fueron tomadas inmediatamente preparadas las bebidas y estas fueron trasladadas bajo condiciones de esterilidad y refrigeración al laboratorio de Microbiología, fueron colocadas en vasijas de barro curadas (pretratadas), cubiertas con film plástico a temperatura ambiente para poder dar un seguimiento al proceso fermentativo (simulando la forma tradicional de elaboración de la bebida). Para los análisis se tomaron muestras de las bebidas en tres etapas: inicial (inmediatamente preparada la bebida), fermentativa (cuando se observa burbujeo por producción de CO₂) y final (finalización del burbujeo); además mediante hisopado con quick swab 3M se tomaron muestras de los recipientes donde elaboraban las chichas. Se realizó la siembra en base a lo mencionado en la Norma correspondiente (NTE INEN 1 529-2:99) para lo cual se empleó la técnica de recuento en placa, luego se aislaron las cepas hasta la obtención de cultivos puros mediante la técnica de estría (bacterias y levaduras) y picadura (mohos), teniendo en cuenta las características morfológicas y fenotípicas de los microorganismos de interés (colonias y células), y; finalmente, se procedió a identificar las bacterias por pruebas bioquímicas, los mohos por características microscópicas mediante tinción de azul de lactofenol y comparación con el manual de identificación de hongos y las levaduras mediante Kits de identificación API 20 C AUX. Se logró identificar: 10 cepas de enterobacterias, 12 cepas de bacterias ácido lácticas, 9 cepas de mohos y 9 cepas de levaduras; la presencia de enterobacterias fue únicamente en la etapa inicial. Con todo el análisis que antecede, se puede concluir que la diversidad microbiana encontrada en

cada una de las etapas fermentativas se asocia al entorno donde se elabora, así como al proceso y las materias primas que se emplean en la elaboración de esta bebida tradicional.

ABSTRACT

In the present investigation the microbiological analysis of Chicha de Jora was performed, with samples obtained from artisanal producers of this drink in Cotacachi (Imbabura- Ecuador). Initial samples were taken immediately drinks were prepared and these were brought under sterile conditions and cooling to the microbiology laboratory, they were placed in jars of cured clay (pretreated), covered with plastic film at environment temperature to track the fermentation process (simulating the traditional way of making the drink). For analysis, drink samples were taken in three stages: initial (immediately the drink was prepared), fermentation (when bubbling is observed by CO₂ production) and final (finalization of bubbling); also by swabbing with 3M quick swab were taken samples of the vessels where chichas were produced. Sowing was carried out based on the relevant Standard (NTE INEN 1 529-2: 99) for which the plate count technique was used, then the strains were isolated to obtain pure crops through fluted technique (bacteria and yeasts) and bite (molds), considering morphological and phenotypic characteristics of the microorganisms of interest (cell and colonies), and; finally proceeded to identify bacteria by biochemical tests, molds for microscopic characteristics by means of lactofenol blue staining and comparison to manual identification of fungi and yeasts identification trough Kits API 20 C AUX. It was possible to identify 10 strains of enterobacteriaceae, 12 strains of lactic acid bacteria, 9 mold strains and 9 strains of yeasts; the presence of enterobacteriaceae was only in the initial stage. With all the above analysis, it can be concluded that microbial diversity found in each of the fermentation stage was associated with the environment where it is made, and the process and raw materials used in the production of this traditional drink.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados, especialmente los que se producen de forma tradicional se obtienen mediante fermentaciones naturales, es decir, no se añaden inóculos sino que actúan los microorganismos naturalmente presentes en el alimento. Una alternativa para la determinación de la estructura microbiana de estos alimentos es aislar microorganismos y tipificarlos (Díaz & Wachter, 2003).

Se debe tomar en cuenta que las fermentaciones naturales y la elaboración de productos en los que se utilizan procesos de fermentación controlados por el hombre, se puede encontrar una gran diversidad de levaduras. Tradicionalmente, las levaduras han sido utilizadas en la industria para la producción de alcohol (etanol) y de dióxido de carbono (CO₂) (García, 2012).

Por otro lado existe un gran número de alimentos fermentados que se producen en forma regional y que no se conocen fuera de su lugar de origen, por ende estos alimentos forman parte de una dieta de muchos grupos étnicos, los cuales se han consumidos desde tiempos inmemorables. Los métodos tradicionales de producción de estos alimentos son sencillos, baratos, no requieren de alta tecnología y utilizan materias primas disponibles y de bajo costo (García, Quintero y Ramírez, 1993).

En Latinoamérica se consumen varias bebidas tradicionales fermentadas a partir del maíz, por ejemplo: el pozol es una bebida que se consume en el sureste de México y en algunos países de Centroamérica (Alvarado, 2011). Se puede consumir recién elaborado o fermentado. Tradicionalmente se consume solo (pozol blanco), aunque también es común agregarle cacao o coco. No se añade un inóculo a la masa pero se introducen grandes cantidades de microorganismos sobre todo durante la molienda. Una gran variedad de microorganismos se desarrollan, dentro de los cuales destaca las bacterias lácticas, que acidifican la masa, y los mohos y levaduras que

contribuyen a la producción de aromas y sabores (Jiménez, González, Magaña, & Corona, 2012).

Se dice que no todos los grupos indígenas consumían bebidas alcohólicas, pero en la actualidad están generalizadas. El producto más utilizado para estas preparaciones es el maíz, cuya costumbre se extendió desde Centroamérica. No obstante, en cada región hay preferencias por materias primas diferentes (Solarte, 1991). La chicha es una bebida alcohólica tradicional producida en Colombia y otros países suramericanos como Ecuador, Perú y Bolivia (López, Ramírez, Mambuscay, & Osorio, 2010).

La chicha de jora es una bebida tradicional de la provincia de Imbabura-Ecuador, es consumida principalmente en festividades, como la fiesta del sol o “Inti-Raimi” y el “Corpus-Christi” (Solemnidad del cuerpo y la sangre de Cristo). La chicha de Jora lleva el nombre por sus fiestas que se celebran en septiembre en las fiestas de la Jora (Rivera, 2014).

La elaboración de esta bebida es un tanto compleja, puesto que la jora o winapu, es decir los granos de maíz que ya han sido germinados, son molidos en una batea casera o a su vez son llevados a un molino a fin de obtener la harina de granulación intermedia, posterior a este procedimiento la harina es colocada en una vasija con agua, y se añade una pequeña cantidad de harina de trigo para que finalmente sea calentada y hervida por un tiempo estimado de 6 horas. Una vez realizado el proceso de cocción, se retira del fuego y se cuela el líquido también conocido como “uppi” o “apuñado” y se deja enfriar toda la noche. Al día siguiente el brebaje es traspasado a una vasija, en donde también se coloca “borra” este nombre se atribuye al concho o sedimento de una chicha previa, y es así como se da inicio al proceso de fermentación (IICA-PROCIANDINO, 1995).

Una limitación en la fermentación del maíz artesanal, es que se requieren microorganismos como levaduras y bacterias cuyas cepas silvestres son muy poco eficientes y actúan muy lentamente. Una opción a ello es el uso de levadura comercial en la fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*), sin

embargo el tiempo de duración del proceso y el rendimiento de producción de etanol (menor al 10%) son poco eficientes. Existen además algunos inconvenientes que surgen en el proceso como la posibilidad de ocurrencia de la fermentación del ácido acético en la bebida, con la bacteria *Clostridium acetobutylicum* que toma de 36 a 200 horas y la concentración es del 2% al 10% de acetona y butanol (IICA-PROCIANDINO, 1995).

Ya que las fermentaciones espontáneas a partir de diversos sustratos representan hábitats de gran importancia para el estudio de la dinámica de las poblaciones de microorganismos nativos (Mambuscay-Mena, Osorio-Cadavid, López y Ramírez, 2010) y que los estudios publicados sobre la microbiología de la bebida Chicha de Jora elaborada en Ecuador son escasos, se realizó la presente investigación con los siguientes objetivos:

Por los motivos mencionados es importante identificar la diversidad microbiana presente en la Chicha de Jora producida en el cantón Cotacachi - Provincia de Imbabura.

Con esto los objetivos son determinar la carga microbiana (enterobacterias, bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras) a lo largo del proceso de elaboración de la bebida Chicha de Jora y aislar e identificar los microorganismos presentes (enterobacterias, bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras) en las tres etapas del proceso de elaboración de la Chicha de Jora (inicial, fermentativa y final).

2. MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El proceso de la fermentación alcohólica es la transformación de un mosto azucarado, hasta un producto alcohólico, en un medio anaerobio y por la acción de microorganismos generalmente levaduras, teniendo nutrientes suficientes, temperatura adecuada, pH, y acidez óptima, de tal forma que la levadura puede desarrollarse adecuadamente sobre los azúcares y la fermentación sea correcta para la formación de alcohol etílico (Grainger & Tattersall, 2005).

La ecuación simplificada que da (Pazmiño, 2013) de la fermentación del azúcar es la siguiente:

[1]



Por lo tanto aproximadamente se obtiene la mitad de alcohol que el peso de azúcar empleado (Verlag, 1987).

El tiempo de duración aproximado de esta fermentación es de una semana a una temperatura de 20°C y es visible por una disminución de la densidad. La oxidación del carbono permite la generación de CO₂ junto con el etanol, en estas reacciones hay una liberación de moléculas energéticas, la cual es utilizada por organismos fermentadores (Vicent, Álvarez, & Zaragoza, 2006).

Para Campbell (2005), la fermentación alcohólica, convierte el piruvato en etanol (alcohol etílico) en dos etapas. En la primera etapa libera CO₂ del piruvato que se convierte en el compuesto de dos carbonos acetaldehído, mientras que en la segunda etapa, el acetaldehído es reducido por el NADH a etanol. Esto regenera la provisión de NAD⁺ necesaria para la continuación de la glucólisis. El proceso completo de la fermentación se detalla en la Figura 1.

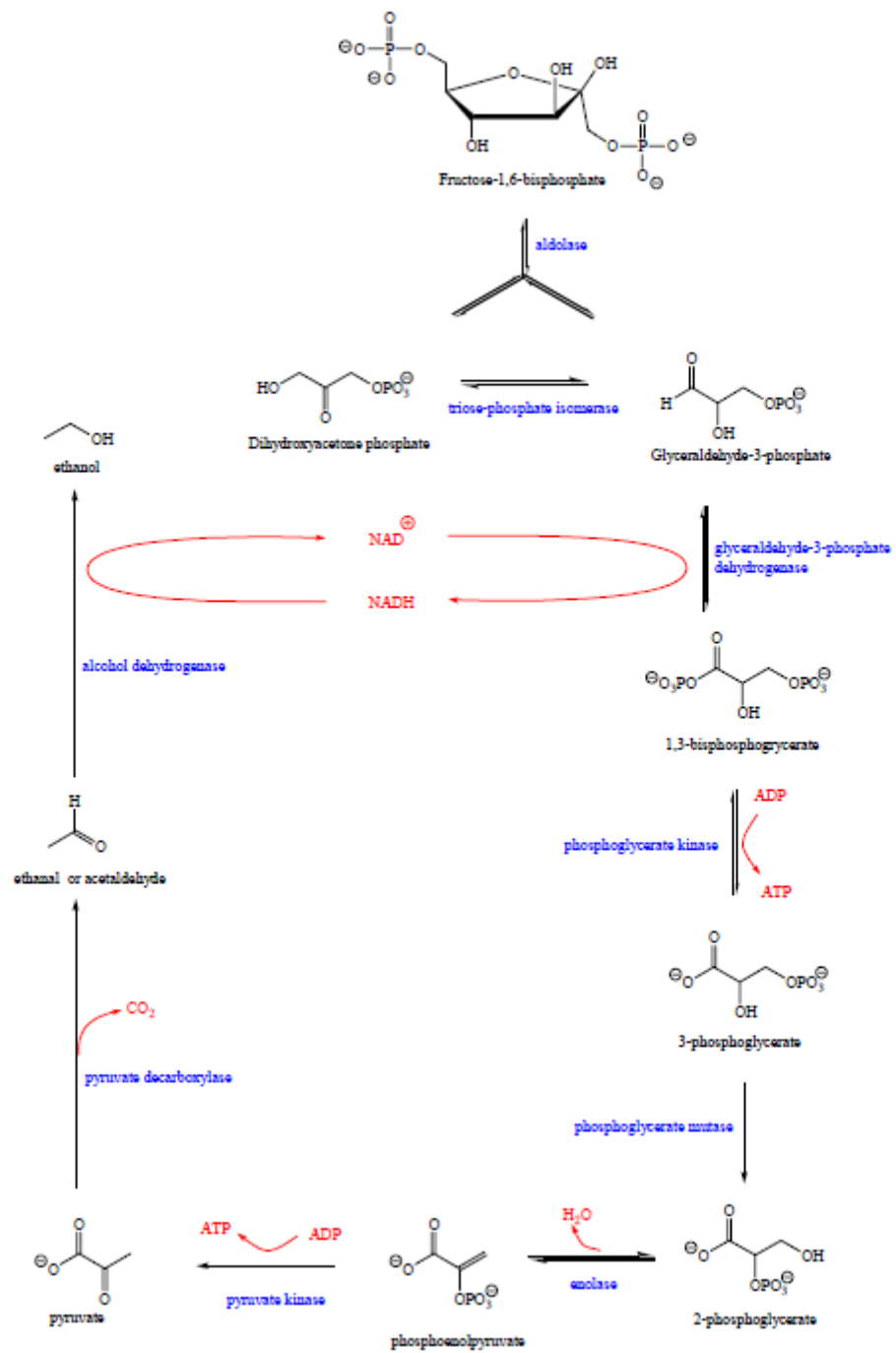


Figura 1. Fermentación alcohólica, ruta completa (Campbell & Reece, 2007).

En la fermentación alcohólica se tiene tres fases, la primera es la fase preliminar, la cual es el momento en el que la levadura entra en contacto con el mosto, esta fase se caracteriza por la intensa multiplicación de las

levaduras; luego la fase tumultuosa, en la cual oxidan los azúcares convirtiéndolos en CO₂ y produciendo etanol; la fase final se caracteriza por disminución de la temperatura y el cese del desprendimiento de CO₂ (Gilces & Veloz, 2006).

La fermentación en la industria se ha venido desarrollando y tomando algunas modificaciones con el fin de buscar mejoras en los procesos de fermentación, tal es el caso de la fermentación continua, con el fin de obtener una mayor cantidad de etanol. Con el avance de la biotecnología se han desarrollado cepas de levaduras mejoradas para lograr un mayor rendimiento de producción (Pazmiño, 2013).

2.2. BEBIDAS FERMENTADAS ECUATORIANAS

El Ecuador se caracteriza por su tradicional bebida denominada “chicha” que proviene del kuna chichab, que significa “maíz” o del náhuatl chichiatl: “agua fermentada”; como su significado lo indica, esta bebida está hecha a base de maíz (Villegas, 2005).

Así mismo otras provincias del Ecuador, poseen chichas propias del lugar y a su vez se diferencian por la variedad que ofrecen, es así que dependiendo del lugar varía la preparación, los ingredientes con la cual la realizan, el nombre que le dan y en muchos casos la ocasión o festividad en las que son consumidas (Negrete, 2012).

2.2.1. BEBIDAS FERMENTADAS POR REGIONES

En la Sierra según Aguirre (2009), se puede encontrar la tradicional chicha de jora que está hecha a base del fermento de una variedad especial de maíz es endulzada con panela. Es así que destaca a la provincia de Chimborazo por la variedad de chichas que ofrece, entre ellas la chicha

andina preparada a base de jugo de piña fermentado; otra es la chicha de ciruela que se la realiza con pasas y finalmente la chicha de colta que es muy parecida a la chicha de jora, con la diferencia que se la realiza con chicha de jora que proviene de maíz de color negro.

En el cantón Guano, también se puede encontrar la particular chicha “huevona”, este nombre es atribuido por los ingredientes que se usan para su elaboración, tales como: huevo, cerveza, puntas y azúcar.

Asimismo en la Amazonía, aún se conservan formas ancestrales para elaborar este tipo de bebidas; aquí se destacan tres tipos de chicha hechas a base de yuca, chontaduro y ayahuasca, y sus nombres hacen referencia al ingrediente principal respectivamente (Negrete, 2012). Aguirre (2009), destaca una forma muy particular de preparar la chicha, en la cual las mujeres mastican los tubérculos de yuca y la dejan fermentar en vasijas de barro.

En la provincia de Bolívar, las bebidas más representativas son la chicha de arroz, chicha de Jora y el pájaro Azul, sin embargo, se produce una variedad de chichas a base de cereales y otros ingredientes como: morocho, machica, avena, quinua, afrecho de harina de trigo, remolacha, hongos, zanahoria amarilla. La producción de estas bebidas se realiza artesanalmente, por lo cual, no existe una aplicación de buenas prácticas de manufactura durante el proceso (Escudero, 2014).

En la provincia de Pichincha la elaboración de la Chicha de Jora, es una de las bebidas más frecuentes que no ha perdido su tradición a través del tiempo, otras como el Guarapo, el Chaguarmishque, Chicha de Avena y la Chicha de Morocho, son bebidas que son consumidas frecuentemente; sin embargo pocas personas las elaboran. Además se destaca la producción de vino de mandarina en el cantón Quito (Carrera, 2014).

En la provincia de Tungurahua las bebidas más populares y de mayor consumo son: “Chaguarmishque”, “Sánduche”, Chicha de uva y algunos vinos que tienen como cantones de procedencia Pelileo, Baños de Agua Santa y Patate respectivamente (Rivera, 2014).

2.2.2. BEBIDAS FERMENTADAS DE IMBABURA

Esta provincia ubicada al Norte del Ecuador, posee mucha riqueza en su cultura y folklor, misma que está representada por sus costumbres y tradiciones que se mantienen de generación en generación, principalmente en la cultura indígena. A su vez Imbabura se destaca por su riqueza artesanal, pero sobre todo gastronómica, pues el maíz es el principal alimento en la base de su alimentación, ya que se lo consume a manera de tostado, choclo, y especialmente es el ingrediente fundamental en la elaboración de la chicha (Montúfar, 2006).

En la ciudad de Otavalo, a más de consumir la chicha como bebida fermentada, se elabora en una paila de bronce el tradicional “champús” a base de harina de maíz y se la fermenta con levadura, a la misma se le incorporan otros ingredientes que son sazonados con miel, a más de esta bebida realizan una chicha de mashua (Montúfar, 2006).

Otra ciudad es Cotacachi, aquí se fabrica la “chicha de penco” ó “Chaguarmishque” en base a la sabia dulce del penco negro, la cual se recoge y se fermenta; las personas de las comunidades que la elaboran comentan que la bebida está lista para ser consumida cuando el jugo ha tomado un color oscuro y empieza a fermentarse (Ramírez & Williams, 2003).

En las festividades andinas no puede faltar la célebre chicha del “yamor o yamor asuwa”, esta bebida es muy especial pues hay una celebración en su nombre y se destaca por su procedimiento laborioso a más de los múltiples ingredientes que la componen son harina de 7 variedades de maíz estos

son: el amarillo, negro, blanco, rojo, chullpi, canguil y morocho blanco, también se añade panela, hierbaluisa y piña (Ramírez & Williams, 2003).

2.2.2.1. Chicha de Jora

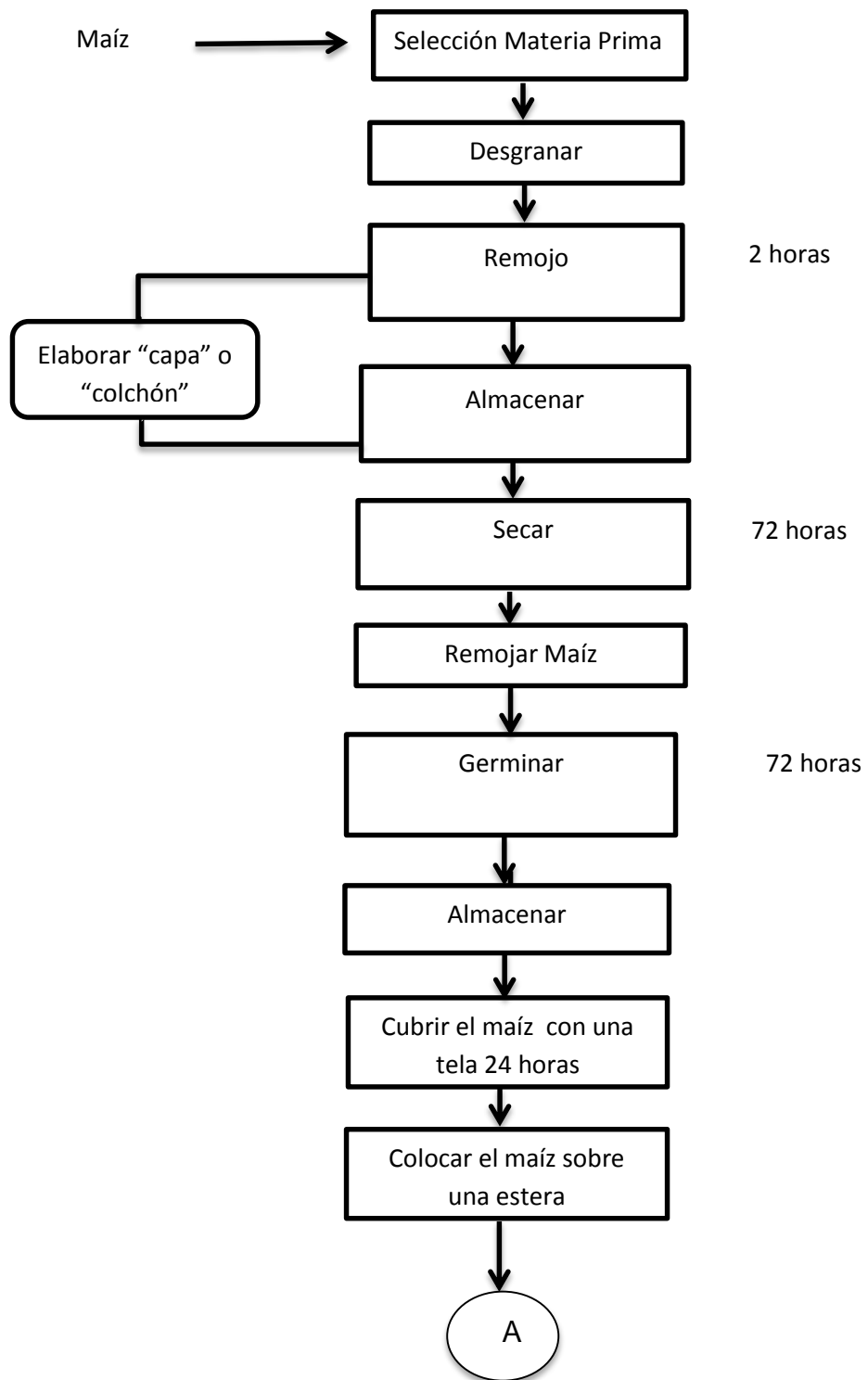
La chicha de jora es sin lugar a duda la preferida por los indígenas del Ecuador, esta bebida juega un rol importante en las comunidades que lo consumen, ya que no solamente es una fuente de alimento y energía, sino que también se la consume en rituales, fiestas y ceremonias religiosas. La chicha de jora es realizada por un tipo especial de maíz llamado jora, este sirve para realizar la “*harina de jora*”. El color de la jora depende mucho del país en donde se la realice, sin embargo en Ecuador se prefiere la jora de color blanco (Kijac, 2003).

Para la elaboración artesanal de la chicha de jora, se establece una serie de pasos sistemáticos: materia prima, cocción, filtración y fermentación. El sabor es la carta de presentación que tienen las chicherías (lugar donde se expende chicha) y las familias. La chicha de maíz contiene entre el 93% al 95% de agua; 0.4% de proteínas; 0.3% de grasa; de 4.9% a 5.8% de carbohidratos, 0.2% de fibra, del 1% al 3% de ceniza (Bayas, Jines, Salazar, & Del Pozo, 2008).

2.2.2.2. Proceso de Elaboración de Chicha de Jora

Una de las productoras de chicha explica que la vasija que se va usar para la elaboración debe ser curada previamente, este proceso consiste en colocar maíz dentro de la vasija, luego llevar al fuego hasta que el maíz se reviente y esté muy caliente, luego se retira del fuego y se deja reposar al ambiente por tres días, la primera chicha que se elabora en la vasija que se está curando se debe desechar, esto permite que la vasija se adapte y que no absorba la chicha (Farinango, 2013).

El proceso general de elaboración de la bebida se resume en la Figura 2.



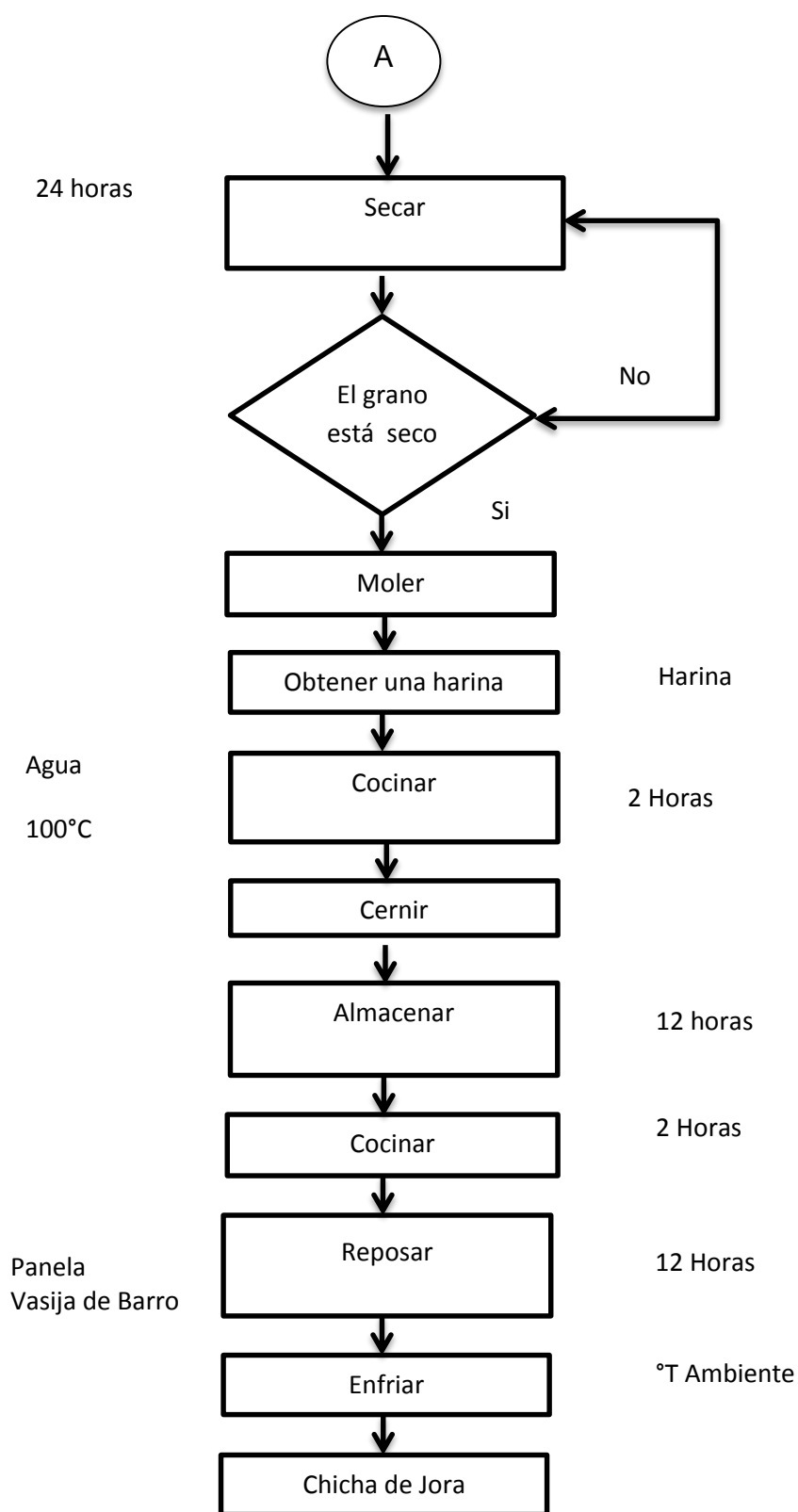


Figura 2. Diagrama de flujo de la elaboración de la Chicha de Jora

2.3. MICROBIOLOGÍA DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS

2.3.1. HONGOS

En términos generales se los define como vegetales pertenecientes al grupo de los *talofitas*, pueden tener una estructura unicelular o pluricelular, y son caracterizados por la ausencia absoluta de clorofila y por ser típicamente filamentosos (Pascual & Calderón, 2000).

Los hongos unicelulares están formados por células redondas u ovaladas denominadas levaduras, por otro lado los hongos que tienen una estructura pluricelular, están constituidos por células alargadas las cuales crecen por extensión de sus extremos, tabicándose de un modo más o menos completo, en la cual forma largos filamentos denominados hifas, estas suelen ramificarse con frecuencia. A estos hongos se los conoce como mohos, que conforme van creciendo se forman matas de filamentos entrelazados, esto se puede apreciar en el pan o en las frutas enmohecidas (Prats, 2007).

2.3.1.1. Importancia de los hongos en bebidas fermentadas

Los hongos son capaces de utilizar una diversidad de materiales orgánicos, tanto sencillos como complejos. Los carbohidratos simples como la glucosa, sacarosa y maltosa son una fuente de carbono idónea para los hongos, así mismo, compuestos más complejos como el almidón y la celulosa, pueden ser aprovechados para obtener energía. Los hongos son capaces de utilizar nitrógeno orgánico, y algunas especies son capaces de usar nitrógeno inorgánico como las sales de amonio. Los hongos pueden elaborar una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, como lipasas, pectinasas y proteinasas, las cuales les ayudan a degradar y asimilar los compuestos orgánicos (Cortéz, 2005).

Los hongos pueden interferir durante la fermentación alcohólica, pudiendo ser beneficioso o perjudicial. La utilización de hongos ha sido empleada en la industria para la producción de ácido glucónico, el cual es obtenido a partir de la fermentación de la glucosa por el *Aspergillus Niger*, lo que ha permitido obtener un producto con mayor pureza y mayor rendimiento (Illana, 2007).

Los hongos, son utilizados en la fermentación de bebidas, el kéfir es un ejemplo de la fermentación de hongos, en el cual actúan como organismos fermentadores un consorcio microbiano de levaduras y bacterias, jugando un papel importante en acidificación de la bebida (Fula, 2010).

Una bebida fermentada llamada Kombucha, es una infusión de té tradicional, que consiste en el crecimiento del hongo llamado *Kombucha*, este se alimenta de los azúcares existentes en la bebida, la variedad de bacterias y levaduras existentes colaboran para realizar la fermentación y para la formación de un hongo dentro del recipiente, que está conformado por varias capas. Los principales metabolitos producidos son ácido acético, ácido láctico, ácido glucónico, así como la producción de etanol (Illana, 2007).

2.3.2. LEVADURAS

Las levaduras son microorganismos eucarióticos, anaeróbicos facultativos y heterotróficos, son hongos unicelulares, no filamentosos, con una morfología característica, las cuales pueden ser esféricas u ovaladas (Santamarina Siurana, García Breijo, & Caselles, 1997) (FAO, 2001).

Las levaduras se las puede encontrar distribuidas en la naturaleza, por lo general se encuentran en forma de polvillo blanco recubriendo hojas y frutos. Estas, en su mayoría, forman colonias de organismos unicelulares, las cuales van creciendo conforme aumentan el número de levaduras. Existen muy pocas levaduras que su multiplicación celular lo realizan por gemación, cuyo proceso radica en que la célula parental, se divide y forma dos células hijas. Las levaduras tienen la capacidad de que su crecimiento sea como

anaerobios facultativos, así mismo, si existe la presencia de oxígeno, las levaduras realizan una respiración aerobia, donde metabolizan los azúcares para obtener como producto final CO₂ y H₂O (Santamarina Siurana, García Breijo, & Caselles, 1997).

2.3.2.1. Importancia de las levaduras

Las levaduras dentro de la industria de los vinos juegan un papel importante, ya que estas son microorganismos encargados de la transformación del jugo de uva en vino, resaltando principalmente la expresión de los aromas de las variedades utilizadas y aportando aromas de fermentación, con el cual pueden enriquecer y resaltar el vino (Medina, 2007).

Las levaduras contienen más de 50% de proteínas, vitaminas, enzimas y aminoácidos. Los tres tipos de levaduras más utilizadas en la industria son: *Saccharomyces* y *Candida*, la cual crece bien en el etanol y en el licor de sulfito, en la melaza y *Kluyveromyces*, que crece en la lactosa. Las levaduras activas son producidas para la industria de panadería, vinaterías, cervecerías y destilería, mientras que las levaduras inactivas son fabricadas por su valor alimenticio, ya que son fuente de proteínas, vitaminas, sabores, fuente de enzimas (Muller & Riel, 1990).

En la elaboración de vinos dulces, se sabe que las fermentaciones a bajas temperaturas mejoran la calidad del vino, y a su vez reduce las toxinas producidas por las levaduras, sin embargo a bajas temperaturas las levaduras crecen lentamente sin embargo el uso de levaduras osmotolerantes inmovilizadas permite una mayor rapidez y productividad de la fermentación a temperaturas bajas (García, 2012)

2.3.3. BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos que pertenecen al reino procariota, las cuales tienen como características, poseer una estructura celular simple y carecer de una membrana nuclear. Estos pueden crecer sin la ayuda de un organismo superior. Las bacterias pueden reproducirse por división simple o fisión binaria, sin embargo cada célula es fisiológicamente independiente, por eso se dice que las bacterias son organismos unicelulares (Negróni, 2009).

En las bebidas fermentadas se ha encontrado una bacteria que es capaz de producir etanol, la cual ha sido aislada en una bebida aislada como pulque, esta cepa *Zymomonas mobilis*, para la producción de alcohol utiliza la vía de Enrner Doudoroff, y de acuerdo al balance energético de esta vía solo se produce un mol de ATP por cada mol de glucosa utilizada (Cervantes, 2008).

Alrededor del mundo existen varias leches fermentadas a base de bacterias, teniendo gran importancia en la industria para desarrollar tanto el aroma como el sabor de estos productos. Estos microorganismos principalmente producen ácido láctico, que producen una disminución del pH lo cual genera la formación de geles, dando la consistencia característica de las leches fermentadas (Gonzales, 2002).

2.3.3.1. Importancia de las bacterias

La humanidad ha usado sin saberlo microorganismos, los ha empleado para la preparación y conservación de alimentos, mejorar cosechas y eliminar residuos. Así es como todas las bacterias ácido lácticas son utilizadas, ya que estas fermentan diversos azúcares, produciendo ácido láctico en cantidades elevadas, permitiendo inhibir o matar otros organismos, además que los productos metabólicos de estas bacterias, producen un agradable sabor, permitiendo usar estas bacterias para elaborar col ácida, ensilado del

pienso, conservas vegetales, mantequilla, yogurth, elaboración de queso fresco y maduro (Tortora, Funke, & Case, 2007).

La aplicación de las bacterias es muy amplia, algunos de los ejemplos más comunes se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de Bacterias Utilizadas Industrialmente

<i>Bacteria</i>	<i>Producto</i>
<i>Acetobacter</i>	Vinagre
<i>Acetobacter suboxydans</i>	Sorbitol
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Yogurt
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ácido láctico
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Acetona, butanol
<i>Streptomyces griseus</i>	Estreptomina

(Hernández, 2003)

La fermentación maloláctica del vino se provoca por la actividad metabólica en ciertas bacterias lácticas adaptándose a este medio. Estas producen una reducción en la acidez y una modificación en el sabor; producto de esta fermentación, se influye positivamente en el sabor y la calidad del vino, ya que algunas cepas de bacterias ácido lácticas producen cambios notorios a nivel organoléptico (Palacios, Krieger, Suarez, & Heras, 2009).

Las bacterias ácido lácticas son usadas en la industria para la elaboración de bebidas fermentadas y alimentos probióticos, los cuales sirven como complementos alimenticios. Existen diferentes tipos de bacterias clasificadas por el modo de la fermentación de la glucosa, se encuentran a las homofermentativas que poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico

como producto principal de la fermentación de la glucosa, mientras que las heterofermentativas aparte de la producción de ácido láctico producen acetato, etanol, y CO₂, por tal motivo su importancia en la industria se relacionan con la producción de sustancias que intensifican sabor, y aroma como el acetaldehído y diacetilo (Ramírez, Ulloa, Velázquez, Ulloa, & Arce, 2011).

2.4. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

2.4.1 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

Existen diferentes claves para la identificación de hongos, una de ellas es “CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria” la cual pertenece a la Commonwealth Micological Institute, donde se describen las especies de hongos entomopatógenos. Este tipo de caracterización se basa en la descripción de la colonia de forma macroscópica y de las estructuras microscópicas (Pazmiño, 2013).

2.4.2 IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Las pruebas más rutinarias de identificación de levaduras, son la fermentación de azúcar y de fuentes de carbono; el crecimiento sobre diversas fuentes de nitrógeno, vitaminas y condiciones de crecimiento como temperatura, elevadas cantidades de azúcar, hidrólisis de urea y resistencia a antibióticos (Gutiérrez, 2007).

El estudio morfológico comprende la evaluación macroscópica, que consiste en examinar en un determinado medio de cultivo características de la colonia tales como: color, textura, topografía de la superficie y los bordes de la colonia; todos estos caracteres pueden variar de acuerdo a la fuente de carbono. Por otro lado existe la evaluación microscópica, que se analiza la

presencia o ausencia de hifas, pseudohifas, cápsula, blastoconidias, artroconidias, ballistoconidias, entre otras. (Mendoza, 2005).

Ciertas características microscópicas permiten la identificación de algunas especies de levaduras. Las características más usadas son: la prueba del tubo germinal o filamentación precoz, formación de hifas, blastoconidias, clamidosporas y astroesporas, tinción Gram (Linares & Solis, 2007).

Las levaduras degradan los nutrientes del medio, esto es posible a través de las evaluaciones nutricionales de sustratos específicos, permitiendo conocer el patrón catabólico que puede presentar un género o especie. De este análisis se puede realizar ensayos de asimilación y fermentación de carbohidratos. El auxonograma (capacidad de asimilación del azúcar) se detecta por el crecimiento visible y el cambio del indicador de color en el medio de cultivo, mientras que en el zimograma, se detecta a través de la producción de gas (hidrógeno y anhídrido carbónico) (Mendoza, 2005).

Los resultados se deben comparar con los patrones de asimilación y fermentación para la identificación. En la detección de las enzimas se emplea la prueba de ureasa, la cual mide la capacidad de la levadura para hidrolizar la molécula de urea dando como resultado dos moléculas de amonio por la acción de la enzima ureasa, generando un incremento en el pH del medio y un viraje de color de naranja a fucsia. Otra prueba que se realiza es la de la fenol-oxidasa, la cual es positivo si el medio cambia a un color oscuro o negro (Mendoza, 2005).

2.4.3 IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

La identificación de bacterias es la determinación de la especie a la que pertenece, el serogrupo, e incluso la cepa, sin embargo para la identificación es esencial que se obtenga un cultivo puro que se puede obtener aplicando diversas técnicas de aislamiento que permitirá determinar la morfología y

agregación, que a través de la Tinción Gram (De la Rosa, Prieto, & Navarro, 2011).

Se puede diferenciar a las diferentes especies de bacterias, dependiendo de su comportamiento enzimático utilizando las pruebas bioquímicas, además este procedimiento permite obtener información acerca del nicho de la especie del ecosistema (Tortora, Funke, & Case, 2007).

Las pruebas bioquímicas se realiza inoculando, las bacterias en diferentes medios de cultivo, y en distintas condiciones de incubación; dentro de las pruebas bioquímicas que se realizan se tienen las siguientes:

- Crecimiento de bacterias en ausencia o presencia de oxígeno, indicará si son aerobias o anaerobias.
- Crecimiento en un agar compuesto de sangre, indicará si es hemolítica, betahemolítica o alfa hemolítica.
- Si una bacteria al contacto con agua oxigenada produce burbujas, indica que posee la enzima catalasa.
- El tipo de vía metabólica, que la bacteria usa para obtener su energía indicará si es oxidativa o fermentativa. En esta prueba se debe realizar, sembrando las bacterias en un medio como el TSI, el cual indicará si las bacterias pueden fermentar solo glucosa, lactosa, sacarosa o fermentan los tres tipos de azúcar, o a su vez no fermentan ninguno, además se puede observar si producen gas que proviene de la fermentación, y la producción de H₂S (Rodríguez, Gamboa, Hernández, & García, 2005).

Otras pruebas bioquímicas empleadas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Principios, modos de acción y aplicaciones de algunas pruebas bioquímicas rápidas.

Prueba	Enzima bacteriana	Aplicaciones
Indol	Triptofanasa	Reacción positiva (color rojo) identifica a <i>E coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> .
ONPG	β - galactosidasa	Determina la fermentación de lactosa (color amarillo) en fermentadores lentos de la lactosa. Diferencia por ej. <i>Neisseria</i> .
Oxidasa	Citocromo C oxidasa	Diferenciación entre los no-fermentadores (reacción +, color azul-morado)
Catalasa	Catalasa	Diferenciación de <i>Staphylococcus</i> (reacción+ con burbujeo) de <i>Streptococcus</i> (reacción -) y de <i>Listeria</i> de los <i>Streptococcus</i>
Solubilidad en bilis		Identificación presuntiva de <i>Streptococcus pacumontae</i> (colonias lisadas) en cultivos de esputo, sangre o LCR.
PYR (L-pirrolidonil-B-naftilamida)	L-pirroglutamilamino-peptidasa	Identificación de <i>Streptococcus</i> del grupo A. Diferencia <i>Enterococcus</i> de los estreptococos del grupo D (reacción +, color rojo brillante)
Ureasa (rápida)	Ureasa	Prueba de cribado (positiva, color rojo) para <i>Cryptococcus</i> , <i>Protcus</i> , <i>Klebsella</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> .
Hipurato (rápido)		Especiación de <i>Streptococcus agalactiax</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>listeria</i> .

Continuación

Plasmocoagulasa		Diferencia <i>S. aureus</i> de <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativos.
------------------------	--	---

(De la Rosa, Prieto, & Navarro, 2011; Rodriguez, Gamboa, Hernández, & Garcia, 2005)

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1. INVESTIGACIÓN DE CAMPO

Inicialmente se realizó una investigación de campo en la provincia de Imbabura, cantón Cotacachi, la cual consistió en la búsqueda y selección de dos productores de chicha de jora pertenecientes al grupo semi-industrial UNORCAC (Unión de Organizaciones Campesinas de Cotacachi), con el objeto de analizar el proceso de elaboración, así como conocer las condiciones y el entorno donde se elabora esta bebida.

3.2. TOMA DE LA MUESTRA

Se tomaron muestras de Chicha de Jora elaboradas por dos productores diferentes, siendo el primer proveedor de la comunidad de Quitugo y el segundo perteneciente a la comunidad de Peribuela; las mismas fueron elaboradas artesanalmente en sus respectivas viviendas, como se puede evidenciar en la Figura 3.



a) Productor 1- Quitugo



b) Productor 2 - Peribuela

Figura 3. Preparación de Chicha en las viviendas de los productores

Los dos productores usaron como materia prima maíz germinado (jora), panela y agua; los utensilios usados fueron principalmente: vasija de barro, cucharas de palo, colador. Ambos productores cocinaron la chicha de jora con la ayuda del fuego de leña.

Las muestras de las bebidas fueron tomadas desde vasijas de barro inmediatamente después de su elaboración y se procedió a trasladarlas a frascos esterilizados, que fueron llevados para su respectivo análisis al laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica Equinoccial bajo condiciones de refrigeración 4°C

Una vez en el laboratorio estas se colocaron en vasijas de barro pretratadas (por los mismos productores, según procesos ancestrales) y fueron cubiertos con films plásticos y tela para evitar una recontaminación de las bebidas a temperatura ambiente.

Para los análisis microbiológicos se tomaron muestras en las siguientes etapas:

- a) Etapa de elaboración (fin de Coccion)
- b) Etapa de burbujeo (mayor producción de burbujas)
- c) Etapa de finalización (escaso burbujeo)

Se realizó un muestreo de las paredes internas de las vasijas de barro con la ayuda de hisopos Quick Swab 3M.

3.3. AISLAMIENTO PRIMARIO Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PUROS

3.3.1. PREPARACIÓN DE DILUCIONES SERIADAS

Las soluciones seriadas se prepararon según la norma NTE 1 529 – 299 (INEN, 1998) para realizar el recuento de microorganismos de interés de la investigación realizada.

Usando una micropipeta se tomó 10 ml de la muestra, esta se colocó en una botella que tenía 90 ml con agua peptonada bufferada, siendo está la dilución 10^{-1} , luego, se tomó 1 ml de la dilución 10^{-1} y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua peptonada; este mismo procedimiento se volvió a realizar para obtener la dilución 10^{-2} , y las siguientes diluciones necesarias, con el fin de obtener un número realista de microorganismos por ml.

3.3.2. SIEMBRA EN PLACA EN SUPERFICIE

Se empleó la metodología descrita por Yousef y Carlstrom (2006); este recuento permitió conocer la carga total de enterobacterias, mohos, levaduras y bacterias ácido lácticas presentes en la bebida.

El proceso se realizó en una cámara de flujo laminar, mediante la técnica de dispersión en superficie, con el uso de las perlas de vidrio logrando homogeneidad del inoculado. Se tomaron alícuotas de 0.1 ml con el uso de micropipetas a partir de las tres diluciones y estas fueron inoculadas en placas con medios selectivos, como muestra la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de incubación y medios de cultivo selectivos

Microorganismo	Medio de cultivo- Condiciones	Temperatura	Tiempo
Enterobacterias	Agar MacConkey	37°C	12-24 Horas
Mohos y Levaduras	Agar PDA + 40 ppm de gentamicina	25°C	3 a 5 días
Bacterias ácido lácticas (BAL)	Agar MRS Cámara de Anaerobiosis	37°C	24-48 Horas

(Yousef & Carlstrom, 2006)

Se realizó el recuento de colonias y los cálculos correspondientes para determinar la carga microbiana presente.

3.3.3. AISLAMIENTO DE ENTEROBACTERIAS, LEVADURAS, BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se aislaron mediante la técnica de siembra por estría (como lo muestra la Figura 4) según las características físicas y morfológicas de cada colonia, siguiendo lo recomendado por Koneman y Allen (2006) y Gamazo, López, y Díaz (2005).

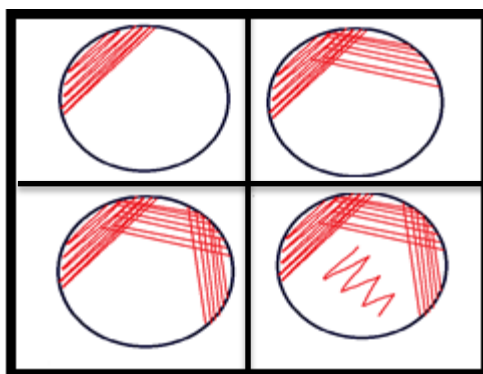


Figura 4. Secuencia de siembra en placa (Koneman & Allen, 2008).

3.3.4. AISLAMIENTO DE MOHOS

Se realizó el aislamiento de cepas de acuerdo a las características físicas y morfológicas propias de cada colonia que se encontró en las placas de recuento, se usó la técnica de depósito con aguja de inoculación. El aislamiento de cada moho se lo realizó por duplicado.

3.4. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

3.4.1. TINCIÓN GRAM

Se empleó la metodología básica de tinción Gram para clasificarlas, tal como lo muestra la Figura 5.

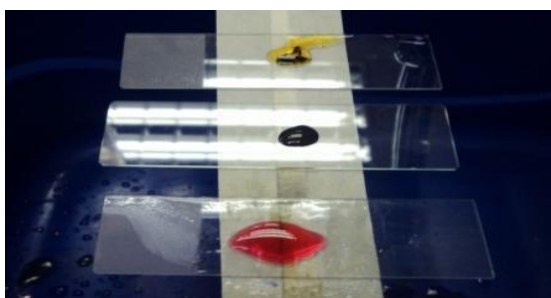


Figura 5. Tinción Gram

La identificación de las cepas aisladas se realizó mediante diversas pruebas bioquímicas detalladas en la Tabla 4.

Tabla 4. Identificación de enterobacterias por pruebas bioquímicas

Prueba Bioquímica	Medio de Cultivo	Condiciones de Incubación °C Tiempo - Siembra	Resultados
Presencia de Lisina Carboxilasa	LIA Lisina Iron Agar – Lisina Hierro Agar	Aerobiosis a 37°C 24 Horas Medio Inclinado, por	1. Descarboxilación de la lisina: . Prueba positiva: Pico violeta / fondo violeta

		punción profunda	. Prueba Negativa: Pico violeta / fondo amarillo 2. Desaminación de la Lisina .Pico Rojizo / Fondo amarillo 3. Producción de ácido sulfhídrico . Prueba Positiva: Ennegrecimiento del medio
Motilidad	SIM	37°C	Positivo: Produce turbidez del medio más allá de la línea de siembra Negativo: El crecimiento se observa solamente en la línea de siembra
Producción de Indol		18-24 horas	Positivo: Desarrollo de color rojo luego de agregar el reactivo de Kovac's Negativos: Sin cambio de color
Producción H ₂ S		Punción profunda con aguja de inoculación recta	Positivas: Ennegrecimiento a lo largo de la línea de siembra Negativa: El medio permanece sin cambio de color
Uso del Citrato	Simons Citrato	Aerobiosis 35-37°C 24-48 horas	Positivo: Crecimiento y color azul en el pico alcalinidad Negativo: El medio permanece de color verde
Producción de Rojo de Metilo	RM-VP (Rojo de Metilo Vogues Prosakauer)	Aerobiosis 35-37°C 3 días	Prueba Rojo de Metilo Se añade gotas de solución de rojo de metilo al 0.04% Positivo: Color Rojo Negativo: Color Amarillo Prueba de Voges

			<p>Proskauer</p> <p>Añadir 0.6 ml de α naftol al 5% en alcohol etílico y 0.2 ml KOH</p> <p>Positivo: Desarrollo de un color rojo en pocos minutos</p> <p>Negativo: Ausencia de color rojo</p>
Fermentación de Azúcares	TSI (Triple sugar iron-Tres azúcares y hierro)	Aerobiosis 35-37°C 48 Horas Siembra por metodo cola de pez	<p>Resultados de fermentaciones:</p> <p>. (Pico rojo/Fondo amarillo) fermenta glucosa</p> <p>.(Pico amarillo/Fondo amarillo) fermenta glucosa, lactosa, y/o sacarosa</p> <p>. (Pico rojo/fondo rojo) no fermenta azucares</p>
Producción H ₂ S			Positivo: Ennegrecimiento
Producción de Gas			Positivo: Presencia de burbujas o ruptura del medio
Tolerancia NaCl Manitol	Manitol Salado Agar	Siembra con técnica cola de pez, en un tubo inclinado Aerobiosis 37°C por 24 horas	<p>Positivo: Amarillo</p> <p>Negativo: Rojo</p>
Enzima Catalasa	Agua Oxigenada	Colocar Agua Oxigenada en un portaobjetos que contenga un inóculo	<p>Positivo: Efervescencia</p> <p>Negativo: No hay ninguna reacción</p>
Enzima Ureasa	Urea Medio	Siembra con técnica cola de pez, en un tubo inclinado Aerobiosis 37°C por 24 horas	<p>Positiva: Rojo-Rosado</p> <p>Negativo: Amarillo</p>

Los resultados de las pruebas bioquímicas antes descritas, fueron comparados con el Manual de Bergey (Holt, 1994).

3.5. IDENTIFICACIÓN DE MOHOS

Para lograr la identificación de mohos se recurrió a la metodología presentada por López, García & Urbano (2012).

Se usó una tira de cinta adhesiva de 5 cm de longitud, y con el lado adhesivo hacia afuera se presionó sobre la superficie del hongo que fue sembrado en una placa. Posteriormente se colocó una gota de azul de lactofenol en el portaobjetos, y sobre esta se colocó la cinta adhesiva presionando firmemente y asegurando que se adhiriera al portaobjetos y el azul lactofenol se distribuya uniformemente, luego se llevó al microscopio para observar las características físicas y morfológicas, las cuales se compararon con el manual *Introduction to Food-Borne Fungi* (Samson, Hockstie, Frisvad, & Filtemberg, 1995).

3.6. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS POR PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Se realizaron las pruebas de, catalasa, SIM y TSI

Además se realizaron las pruebas de anaerobiosis y aerobiosis

3.6.1. PRUEBA DE ANAEROBIOSIS

Se tomó una muestra del microorganismo que se requería aislar, y se sembró por estría doble, en una placa que contenía el medio MRS

solidificado, esta se colocó en una jarra de anaerobiosis y se incubó por 48 horas a una temperatura de 37°C. Luego de este tiempo se observó los resultados.

3.6.2. PRUEBA DE AEROBIOSIS

Se tomó una muestra del microorganismo que se requería aislar, y se sembró por estría doble, en una placa que contenía el medio MRS solidificado, esta se incubó por 48 horas a una temperatura de 37°C.

Los resultados de las pruebas bioquímicas antes descritas, fueron comparados con el Manual de Bergey's (Holt, 1994).

3.7. IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS

Para la identificación de levaduras se empleó la metodología proporcionada por la empresa Biomerieux para la utilización de los kits API 20 C AUX.



Figura 6. Kit API 20 C AUX

Transcurridas de 48 a 72 horas a 29°C de incubación se observaron los resultados, en el cual se da como positivo (+), si se presenta una turbidez en las cúpulas, si son transparentes se reportan como negativo (-). Los resultados se anotaron en la respectiva cartilla de resultados. Se sumaron los signos, se obtuvo el código que fue ingresado en el programa proporcionado por BIOMÉRIUX dando como resultado el nombre de la levadura.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RECUEENTOS MICROBIANOS

En los resultados obtenidos en el recuento de poblaciones microbianas, se observó que existe diversidad de enterobacterias, BAL, mohos y levaduras, siendo la segunda etapa (fase fermentativa) en la que se reportó los valores más altos para microorganismos fermentadores. En la Tabla 5 se puede observar la carga microbiana en las tres fases.

Tabla 5. Recuentos microbianos

Etapas Fermentativas	CARGA MICROBIANA (log UFC/ml)							
	Enterobacterias		BAL		Mohos		Levaduras	
	Productor		Productor		Productor		Productor	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Etapa 1	4,33	3,86	5,28	4,76	4,62	4,86	4,46	4,58
Etapa 2	nd	nd	7,48	7,42	6,33	5,93	6,62	6,83
Etapa 3	nd	nd	7,29	6,70	6,27	5,86	6,21	6,57
PROMEDIO DE LAS 3 ETAPAS	-	-	6,68	6,29	5,74	5,55	5,76	5,99

nd: no determinado

Al ser bebidas fermentadas se pudo visualizar la presencia de consorcios microbianos y se considera que esta interacción positiva es un mecanismo evolutivo que favorece a todas las poblaciones presentes con respecto a la captación de nutrientes y eliminación de ciertos metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida fermentada (Cervantes, 2007).

En las muestras de chicha de jora, se observó que en la primera etapa la carga de enterobacterias era alta con un promedio de 4.09 UFC/ml, mientras que en la segunda y tercera etapa el crecimiento fue nulo. Según el estudio

realizado por Pazmiño (2013) en la chicha de arroz se evidenció altos contenidos de enterobacterias en la etapa inicial del proceso fermentativo, mientras que en las etapas restantes ya no se encontró la presencia de éstas. Esto se puede atribuir a que las bacterias patógenas reaccionan de forma diferente ante la presencia de bacterias ácido lácticas, impidiéndoles por ende que puedan sobrevivir, ya que estas tienen una acción inhibitoria sobre las Gram negativas, asimismo la disminución del pH, no permite el crecimiento de enterobacterias en un medio ácido (Herrera, 2007).

En el trabajo realizado por Carrera (2014), en la chicha de Jora de la provincia de Pichincha obtuvo un promedio de 3.73 log UFC/ml, el cual es cercano al resultado promedio reportado en el presente trabajo, valores altos en enterobacterias en esta bebida pueden generar enfermedades gastrointestinales al consumidor. El contenido de enterobacterias se puede dar por las condiciones donde se realiza el proceso, ya que se encuentra expuesto a contaminación.

La chicha de jora tuvo menores recuentos de enterobacterias frente al promedio 5.01 log UFC/ml de enterobacterias de la chicha de yuca. La diferencia entre las dos chichas y los recuentos se puede atribuir a los diferentes procesos de elaboración y manipulación de los mismos (López, 2014).

En relación al comportamiento de los mohos, se evidencia que en la etapa inicial versus la segunda etapa existe un crecimiento considerable que se mantiene en la tercera etapa, teniendo así un valor promedio de la población de 5.64 log UFC/ml. En el estudio realizado a la chicha de Jora en Cotacachi por Terán (2014), se reporta un promedio de 4.09 log UFC/ml, lo cual difiere con los resultados reportados en este trabajo, siendo mayor con 1.55 log UFC/ml. Por lo cual, al tener un recuento alto en mohos la presente bebida tendría una mayor producción de ácidos orgánicos por la transformación de los azúcares a compuestos más simples. Los recuentos reportados en chicha de yuca realizada por López, (2014) fueron de 4,64 log UFC/ml, y en la chicha de maíz fue de 4.53 log UFC/ml, siendo valores

menores a las encontradas en el presente trabajo, el crecimiento de mohos se debe al medio ácido de la chicha de jora el cual es favorable para el desarrollo y crecimiento de estos microorganismos. A diferencia del recuento reportado por Pazmiño, (2013) con un promedio de 2.25 log UFC/ml en la chicha de arroz se puede ver que la diferencia es considerable y que los mohos son parte de la fermentación de la chicha.

Los recuentos de levaduras fueron muy similares entre los dos productores en las tres diferentes etapas fermentativas, obteniendo un promedio de 5.87 log UFC/ml. En la segunda etapa existió una mayor carga de estos microorganismos.

En el estudio realizado por Kumar & Mishra, (2010) en bebidas fermentadas con frutas tropicales, se observa el mismo comportamiento de crecimiento de levaduras que tiene en la etapa inicial (primer día) de 2.8 UFC/ml y en la segunda etapa (5 días) 4.1 UFC/ml, sin embargo se puede observar que la cantidad inicial de levaduras en la chicha de jora es mucho mayor que la reportada en el estudio con frutas tropicales, siendo 4.6 UFC/ml la mayor cantidad reportada en dicho estudio. Haciendo la comparación con la chicha del Yamor los recuentos promedios de levaduras son de 4.2 log, UFC/ml, evidenciándose una cantidad menor en comparación con la chicha de jora, sin embargo en una bebida colombiana conocida como masato presenta un recuento de 5.30 log UFC/ml, este valor concuerda más con los resultados del presente trabajo, para lo cual se puede definir que la cantidad de levaduras permiten una bebida fermentada con mayor cantidad de alcohol (Terán, 2014).

En cuanto a las BAL, el crecimiento se muestra en las tres etapas fermentativas, teniendo un recuento de BAL promedio de 6.48 log UFC/ml en las tres etapas. En el estudio realizado por Carrera (2014) en la chicha de avena se encontraron recuentos similares con un promedio de 7.76 log UFC/ml, esta cantidad alta de bacterias ácido lácticas se puede atribuir a que los sustratos son similares, y tienen una alta cantidad de carbono, el cual utilizan para su desarrollo y para la fermentación, dando así a la chicha

un pH bajo. En el estudio realizado por (Terán, 2014) en la chicha del yamor y chicha de Jora los resultados promedios fueron de 4.15 log UFC/ml, y 3.58 log UFC/ml, respectivamente, lo cual difiere de los resultados con la chicha del presente estudio que viene dado por diferentes procesos al que puede estar sometido las diferentes bebidas y el tiempo de fermentación empleado.

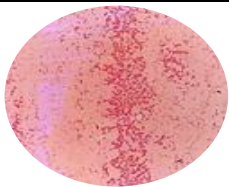
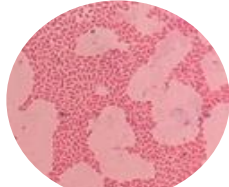

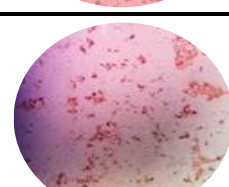
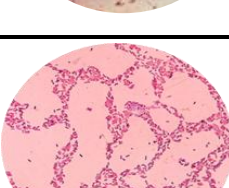
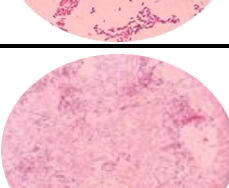
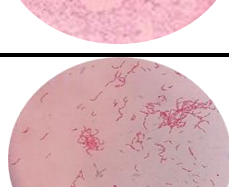
En el Ecuador actualmente, no existe una norma técnica que regule los valores máximos permitidos de carga microbiana en bebidas tradicionales, sin embargo en la ciudad de Cotacachi se exporta chicha de jora para países como Alemania, la mejor forma de controlar estos procesos es mediante buenas prácticas higiénicas en las diferentes etapas productivas.

4.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

4.2.1. ENTEROBACTERIAS

Solo se detectó la presencia de enterobacterias en la primera etapa de fermentación. En la Tabla 6 se detallan las cepas de enterobacterias identificadas

Tabla 6. Cepas de enterobacterias identificadas en la primera etapa de fermentación

COLONIA	DESCRIPCIÓN	FOTOGRAFIA	RESULTADO
1.1	Es lobular y convexa, de color rosado con un punto en el centro de color fucsia de 4 mm		<i>Edwarsiella hoshinae</i>
			<i>Escherichia coli</i>
			<i>Escherichia Fergusoni</i>
			<i>Lecreia (Escherichia) adecarboxylata</i>
1.2	Decoloración en el medio de color ambar, sus colonias son de color café con un punto en el centro de 1,3 mm		<i>Escherichia coli</i>
			<i>Escherichia fergusoni</i>
1.3	Redonda con un pequeño halo alrededor, la colonia es de color fucsia con un punto concavo en el centro de 2,0 mm		<i>Edwarsiella hoshinae</i>
			<i>Escherichia coli</i>
1.4	Es lobular , presenta decoloración en el medio, sus colonias son de color café claro con un punto oscuro en el centro de 2,0mm		<i>Escherichia coli</i>
			<i>Escherichia coli inactive</i>
2.1	Es lobular , presenta decoloración en el medio, sus colonias son de color café claro con un punto oscuro en el centro de 5.0 mm		<i>Shigella boydii S. dysenteriae</i>
			<i>Xenorhabdus beddingii</i>
2.2	Es lobular y convexa, de color rosado con un punto en el centro de color fucsia de 4,0 mm		<i>Escherichia Coli</i>
			<i>Escherichia hermannii</i>
2.3	Redonda color roja con un halo pequeño y un anillo rosado, en el centro es convexo y su superficie es irregular de 2,5 mm		<i>Escherichia coli</i>
			<i>Escherichia fergusoni</i>
			<i>Hafnia alvei</i>
			<i>Lecreia (Escherichia) adecarboxylata</i>

La gran mayoría de las enterobacterias aisladas correspondieron a: *Escherichia coli inactive*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Lecrechia (Escherichia) adecarboxylata*, las cuales habitan en heces, orinas y heridas, pueden estar presentes en los alimentos por una ineficiente manipulación y por malas prácticas higiénicas (Koneman & Allen, 2008).

En relación al resto de cepas encontradas su presencia se atribuye a varios factores. *Edwardsiella hoshina* se reproduce en medios dulces o con alto contenido de azúcares, mientras que *Shigella boydii* y *S. dysenteriae*, se encuentran en alimentos, agua y en las mucosas; al transmitirse estas bacterias por medio del agua o de los alimentos puede desencadenar dolores abdominales, cólico, diarrea. *Xenorhabdus beddingii* se encuentran en los insectos, esta contaminación puede realizarse al momento que el maíz es dejado al aire libre para el secado. *Hafnia Alvei*, se encuentra ampliamente en diseminado en la naturaleza, en aguas residuales, suelo, mucosas, heces, diarrea (Prats & Mirelis, 1998; Janda & Abbott, 2006).

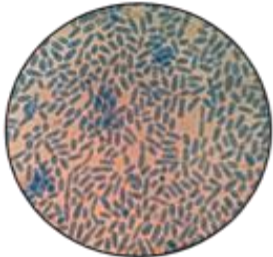
En el trabajo presentado por (Pazmiño, 2013) en la chicha de arroz se encontraron bacterias similares como *Escherichia coli* y *Escherichia fergusonii*, la presencia de estas bacterias se atribuye a las malas prácticas higiénicas en las que se preparan y almacenan la chicha.

4.2.2. MOHOS

4.2.2.1. Etapa I

En la Tabla 7 se detallan las características del moho aislado en la primera etapa.

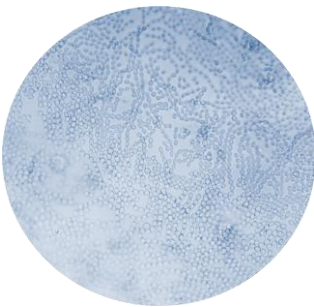
Tabla 7. Mohos identificados en la primera etapa de fermentación de la bebida Chicha de Jora

Colonia	Características fenotípicas	Imagen	Nombre científico
1.1	Redondo de color blanco, su superficie es opaca y su contorno es irregular, 2.1 cm de largo		<i>Moniliella suaveolens</i>

4.2.2.2. Etapa II

En la Tabla 8 se detallan las cepas de mohos correspondiente a la segunda etapa.

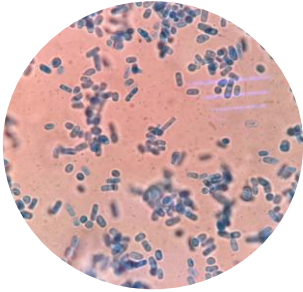
Tabla 8. Mohos identificados en la segunda etapa de fermentación de la bebida Chicha de Jora

Colonia	Características fenotípicas	Imagen	Nombre científico
1,2	Forma redonda de 3.0 cm de diámetro aproximadamente, su superficie es de color verde, y su apariencia es aterciopelado		<i>Moniliella suaveolens</i>

4.2.2.3. Etapa III

En la Tabla 9 se detalla los mohos identificadas en la tercera etapa del proceso fermentativo.

Tabla 9. Mohos identificados en la tercera etapa de fermentación de la bebida Chicha de Jora 3

Colonia	Características fenotípicas	Imagen	Nombre científico
2,1	Blanco redonda de 3,5 cm de diámetro su contorno irregular y su superficie irregular y con un halo con		<i>Geotrichum candidum link</i>

A lo largo de las tres etapas fermentativas se identificaron únicamente dos hongos: *Geotrichum candidum link* y *M. suaveolens*, este último se identificó y se describió en la etapa 2.

La especie *Geotrichum candidum link*, la cual crece en el suelo, agua, aire, detritos, plantas, cereales, productos lácteos y es común en la flora normal humana, la presencia de esta hongo en la bebida podría ser por medio de las paredes de adobe de la casa donde se realizó la chicha, o a su vez por la vasija de barro que se utilizó para el almacenamiento y fermentación (Castro, 2009). La especie *Geotrichum candidum link*, es un hongo que se ha usado en la industria alimentaria láctea, para la elaboración de quesos franceses como Camembert, el cual da un sabor característico, ya que juega un papel importante en aumentar la amargura, esto en la chicha puede atribuirse a un sabor amargo, adicional de la acidez provocada por las bacterias ácido lácticas (Marcellino, Beuvier, Gueguen, & Benson, 2001).

M. suaveolens es un hongo tipo levadura que han sido aislados de plantas y productos alimenticios por lo cual se asume que participa en la fermentación de azúcares presentes en la chicha de Jora. El color de la colonia es amarillo y tiene un tinte de color verde, coloración típica de las cepas de *M. suaveolens* (Ching, 2012). Este hongo puede fermentar la glucosa y la sacarosa, puede crecer en un medio con vitaminas libres (Thanh, Hai, Takashima, & Lachance, 2012).

4.2.3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

En la Tablas 10, 11 y 12 se puede visualizar las diferentes cepas de BAL correspondiente a cada una de las etapas de fermentación. Según la caracterización inicial (microscópica y bioquímica) todas corresponden al género *Lactobacillus* sin embargo se requeriría una caracterización molecular de las mismas para determinar la especie correcta. Se obtuvieron 3 tipos en la etapa inicial, 4 tipos en la etapa fermentativa y 5 tipos en la etapa final; estas fueron distinguidas de acuerdo a su morfología.

Tabla 10. Identificación de bacterias ácido Lácticas en la primera etapa

COLONIA	DESCRIPCIÓN	FOTOGRAFIA
1	Blancas y redondas y cremosas de 2,0 mm de largo (100x)	

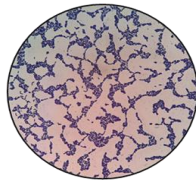
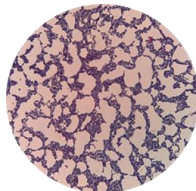
2	Blancas y redondas y cremosas de 1,5 mm de largo (100x)	
3	Blancas cremosas y redondas agrupadas en par, 3,0 mm de largo (100x)	

Tabla 11. Identificación de bacterias ácido lácticas en la segunda etapa

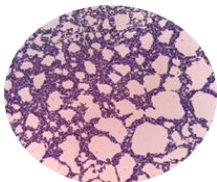
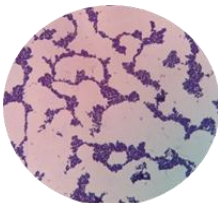
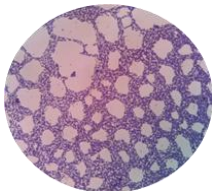
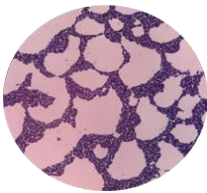
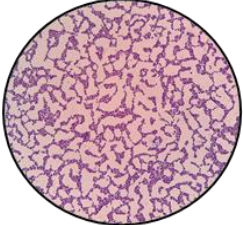
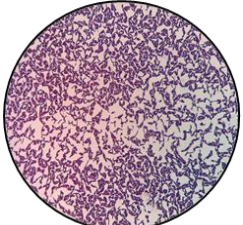
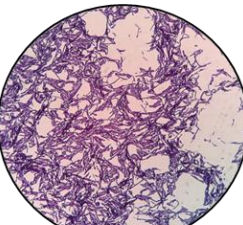
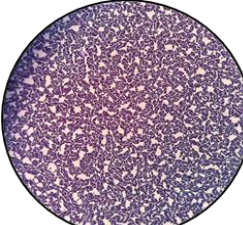
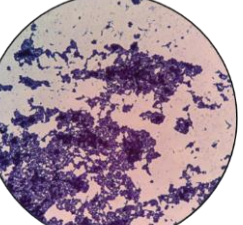
COLONIA	DESCRIPCIÓN	FOTOGRAFIA
4	blancas y redondas de 2,00 mm de diámetro (100X)	
5	blancas y redondas de 2,00 mm de diámetro (100x)	
6	blancas y redondas con un halo alrededor de 1,0 mm de diámetro (100x)	
7	blancas beige redondas convexas de 1,0 mm de diámetro (100x)	

Tabla 12. Identificación de bacterias ácido lácticas en la tercera etapa

COLONIA	DESCRIPCIÓN	FOTOGRAFIA
8	blancas y redondas de 1,50 mm de diámetro (100x)	
9	blancas y redondas de 2,50 mm de diámetro (100x)	
10	blancas y redondas de 7,00 mm de diámetro (100x)	
11	blancas y redondas de 4,00 mm de diámetro (100x)	
12	blancas y redondas de 1,50 mm de diámetro (100x)	

Las bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico están ampliamente distribuidas en la naturaleza, incluyen representantes de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* (Ching, 2012).

La microflora láctica es responsable de la fermentación láctica y/o maloláctica y cumple un rol importante en la preparación de alimentos tradicionales a base de una variedad de frutas, cereales y tubérculos como el maíz, el cual es la materia prima principal de la chicha de jora, donde las bacterias ácido lácticas juegan un papel importante en la fermentación de esta bebida.

Los *Lactobacillus* son bacterias ácido lácticas, capaces de producir sustancias antimicrobianas, las cuales pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Esto se evidenció en la segunda y tercera etapa fermentativa donde el crecimiento de enterobacterias fue nulo y el crecimiento de bacterias ácido lácticas fue en aumento en cada una de las etapas. Los *Lactobacillus* se pueden encontrar en alimentos fermentados artesanalmente como en quesos, yogurth, chicha de jora (Delgado, 2008).

La presencia de esta bacteria se debe a la resistencia a ciertas concentraciones de alcohol.

4.2.4. LEVADURAS

En las Tablas 13, 14 y 15, se detallan las principales levaduras identificadas en las etapas de fermentación evaluadas. Se determinaron inicialmente 20 cepas distintas sin embargo solo se identificaron 9 como las más representativas ya que el resto tenían las mismas características fenotípicas

Tabla 13. Levaduras identificadas en la primera etapa

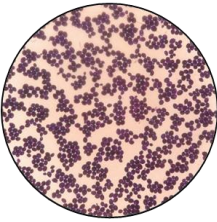
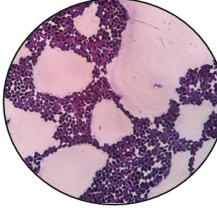
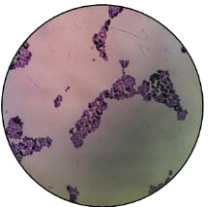
COLONIA	FORMA	FOTOGRAFÍA	RESULTADO
1,1	blancos redondos con un halo y un anillo diminuto de y mucosa de 1 mm de largo (100x)		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1
1,2	blanca redonda en el centro es lobular y su superficie es irregular y opaca de 5.5 mm de largo (100x)		<i>Cryptococcus laurentii</i>
2,1	de forma alargada y delgados, como arroz de 2 mm de largo (100x)		<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> 2

Tabla 14. Levaduras identificadas en la segunda etapa

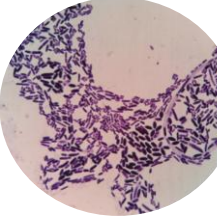
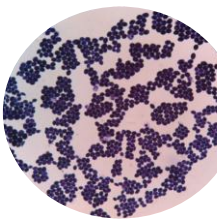
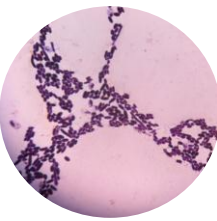
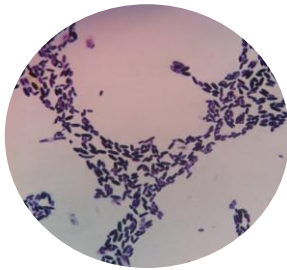
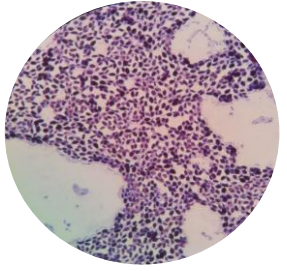
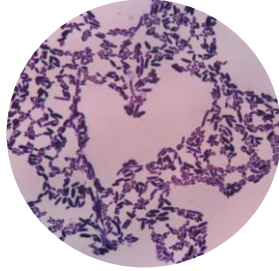
COLONIA	FORMA	FOTOGRAFIA	RESULTADO
1,1	Blancos, redondos y lisos de 2,0 mm de diámetro (100x)		<i>Cryptococcus laurentii</i>
1,2	Blancos, redondos y lisos de 3,0 mm de diámetro (100x)		<i>Candida sphaerica</i>
2,1	Blancos, redondos y lisos de 1,4 cm de diámetro (100x)		<i>Rhodotorula glutinis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1

Tabla 15. Levaduras identificadas en la tercera etapa

COLONIA	FORMA	FOTOGRAFIA	RESULTADO
1,1	Blanca Redonda de 1,00 mm de diámetro pequeña y convexa con un puqueño halo alrededor (100x)		<i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Cryptococcus humicola</i>
2,1	Blanca Redonda de 2,00 mm de diámetro cremosa con un puntito beige en el centro (100x)		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1 <i>Candida magnoliae</i>
1,2	Redondo blanco de 2,00 mm de diámetro convexo y con un halo alrededor (100x)		<i>Cryptococcus laurentii</i>

En las tres diferentes etapas de fermentación se identificaron cepas de *Cryptococcus laurentii*. La contaminación de estas levaduras se puede atribuir a las aves domésticas y silvestres que pueden actuar como portadores de la levadura de la especie de *Cryptococcus*, que son potencialmente patógenas para los humanos (González-Hein, 2010).

La presencia de esta especie puede darse por las condiciones de elaboración de la chicha de jora, ya que estas se realizan en el campo, donde la materia prima queda expuesta a los animales como gallinas, aves, entro otros animales domésticos y silvestres.

En la investigación realizada por Pazmiño (2013), en la provincia de Bolívar-Ecuador, se identificó la presencia de *Candida sphaerica* en una muestra de chicha de arroz, siendo semejante a lo acontecido en la segunda etapa fermentativa de la chicha de jora; esto se atribuye a que el habitat de la *C. sphaerica* comunmente está presente en productos fermentados como el queso, los cereales remojados y de igual forma puede ser encontrada en la piel de humanos así como en la de animales. Así mismo, Pazmiño, (2013) menciona que la presencia de *Candida sphaerica* en la chicha de jora, podría deberse a su elaboración con cereales remojados (maíz, arroz, cebada, entre otros) (Pazmiño, 2013).

Candida sphaerica es una levadura que crece una vez se realice la fermentación alcohólica, ya que depende de este proceso para la obtención de energía metabólica, por tal motivo esta levadura se encuentra presente únicamente en la segunda etapa de fermentación (Dijken, Weusthuis, & Pronk, 1993).

Rhodotorula glutinis es una levadura que puede acumular grandes cantidades de lípidos y tiene la capacidad de producir pigmentos carotenoides, los cuales son de gran aporte para la alimentación por ser precursores de vitamina A y ser antioxidantes (Escobedo, 1995). *R. glutinis*, ha sido aislada de vasijas de barro y piedras de moler maíz, que han sido encontradas en excavaciones arqueológicas que se han realizado en la ciudad de Quito-Ecuador en el sector de Rumipamba, la presencia de esta levadura se debe a que puede encontrarse en ambientes naturales como el suelo, lo cual concuerda con el uso de utensilios de vasija de barro para la elaboración de la chicha de jora (Guaman & Carvajal, 2009).

En Colombia, a partir de levaduras aisladas de muestras de chichas artesanales elaboradas a base de maíz, similar a la chicha de estudio se logró identificar como *R. glutinis*, sin embargo no se encontró en otras chichas hechas a base de piña y arracacha (López, Ramírez, Mambuscay, & Osorio, 2010).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ha estado presente en las diferentes etapas del proceso. Se conoce que la aplicación de esta levadura es amplia, ya que la aceptación en la industria y en la alimentación ha sido significativa.

Candida magnoliae es un tipo de levadura que tiene como habitat natural el suelo, agua de río, agua de mar, agua de lagos, plantas y alimentos fermentados. *Candida utilis* se ha aislado en flores, pero también puede desarrollarse en alimentos fermentados; lo que sugiere que la presencia de estos microorganismos se pueden atribuir a la etapa fermentativa que atraviesa (Kurtzman, 2011).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los recuentos microbiológicos, se evidenció que los valores reportados para todos los indicadores microbianos en las bebidas preparadas por los dos productores son similares, esto debido a que las condiciones de preparación e ingredientes utilizados son parecidos.
- En el proceso fermentativo de la chicha de Jora intervienen bacterias ácido lácticas y levaduras, ya que los dos están presentes en todas las etapas y en número similar.
- Los recuentos de enterobacterias se dieron únicamente en el inicio de la primera etapa fermentativa de la chicha de jora, esto se atribuye a la no presencia en etapas postreras, esto debido a la producción de alcohol y a la cantidad de BAL presentes, que cumplen un papel como germicida que inhibe el crecimiento de este tipo de microorganismos.
- Se encontraron dos cepas de mohos mientras que se identificó una mayor diversidad de levaduras lo cual se puede atribuir a la naturaleza del envase de almacenamiento, en este caso a la vasija de barro, dado que se han logrado aislar levaduras en recipientes similares.
- Conforme a los altos resultados de los recuentos de enterobacterias presentes en la primera etapa, se puede suponer que las condiciones de elaboración de la Chicha de Jora no son las adecuadas para garantizar inocuidad, lo que genera una contaminación de enterobacterias en la bebida.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar pruebas moleculares mediante la caracterización del ADN para la identificación definitiva de las cepas identificadas.
- Es necesario además realizar pruebas posteriores con las cepas identificadas en este trabajo para determinar su capacidad fermentativa y su posible uso comercial como inóculos en fermentaciones industriales.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., & Derkx, P. M. (2012). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC Microbiology*, 12-75.
- Aguirre, H. J. (2009). *Propuesta de una Receta Estándar Para la Elaboración de la Chicha en la Provincia de Chimborazo*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Alvarado, E. (2011). Beneficios del uso de levaduras en rumiantes. **Nutricionista Animal. Lesaffre Feed Additives*, 1-3.
- Aréchiga, H. (1996). *Los Feénomenos Fundamentales de la Vida*. Mexico: Siglo XXI Editores.
- Bayas, A., Jines, D., Salazar, G., & Del Pozo, F. (2008). *Modelización Del Efecto Del Tiempo En La Densidad Y Grados Brix De La Chicha Elaborada A Partir De Cebada Germinada Enriquecida Con Maíz Amarillo (Zea mays)*. Ambato: Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, Universidad Técnica de Ambato.
- Brown, L. R., Flavin, C., & French, H. (1997). *State of the World*. Barcelona: Worldwatch Institute.
- Campbell, N., & Reece, J. (2007). *Biología 7ma Ed*. Madrid: Panamericana S.A.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio Para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Carrera, M. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas de la provincia de pichincha*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Carrera, M. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas de laprovincia de pichincha*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Castro, V. (2009). *Evaluación aeromicológica en la calidad del aire de la zona aledaña al relleno sanitario portillo grande en el otoño del 2009*. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina.

- Cervantes, M. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA*, 135-146.
- Cervantes, M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies de Materiales*, 1-5.
- Ching, T. H. (2012). *Characterization of biocontaminants in biodiesel fuels and potential roles in the formation of microbially induced corrosion*. (T. U. HAWAII, Ed.) HAWAII, HAWAII.
- Cortez, V. G. (2005). *Introducción a la Microbiología* (Segunda Edición ed.). Costa Rica: EUNED.
- Dalby, J. B. (1997). *Los Saraguros del Sur del Ecuador*. Quito: Abya-Yala.
- De la Rosa, M., Prieto, J., & Navarro, J. (2011). *Microbiología en Ciencias de la Salud Conceptos y Aplicaciones* (3ra ed.). Barcelona: Elsevier España, S.L.
- Delgado, C. (2008). *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Díaz, G., & Wachter, C. (2003). *Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados*. México: UNAM.
- Dijken, J., Weusthuis, R., & Pronk, J. (1993). Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Kluwer Academic Publishers*, 343-352.
- Escobedo, Y. (1995). *Estudio Cinético de dos Cepas de Rhodotorula glutinis Crecidas en tres diferentes fuentes de carbono glucosa sacarosa y melaza de caña*. Guadalajara-Jalisco: Universidad de Guadalajara.
- Escudero, B. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas tradicionales de la provincia de Bolívar – ECUADOR*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Eyzaguirre, L. H. (1986). *Sabor y Saber de la Cocina Chilena*. Santiago de Chile: Andres Bello.
- FAO. (2001). *Uso del Ensilaje en el Trópico Privilegiando Opciones Para Pequeños Campesinos*. Roma: FAO.
- Farinango, R. (15 de Octubre de 2013). Elaboración de Chicha de Jora. (H. López, Entrevistador)

- Fula, A. (2010). *Desarrollo de una Bebida Fermentada con Adición de Cocción de Maíz*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Gamazo, C., López, I., & Díaz, R. (2005). *Manual práctico de microbiología*. Barcelona : Masson .
- García, A. S. (2003). *Desarrollo de una cepa etanológica a partir de Bacillus subtilis*. Cuernavaca: Universidad Nacional Autónoma de México .
- García, M. (2012). *Uso de Levaduras seleccionadas osmotolerantes, libres y coinmovilizadas, para la producción de vinos dulces*. Córdoba: Universidad de Córdoba Facultad de Ciencias.
- García, Quintero, & Ramírez. (1993). *Biotecnología Alimentaria*. Mexico D.F.: Limusa Noriega Editores.
- Gilces, P., & Veloz. (2006). *Estudio del Uso de los Nutrientes Para la Levadura en Fermentación con el Propósito de Mejorar la Producción de alcohol Etilico*. Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Gómez, M., & Guidonet, A. (2007). *La Comida en Japón; La Antropología de la Alimentación*. Barcelona: UOC.
- Gonzales, X. (2002). *Utilización del suero de leche para la elaboración de una bebida fermentada*. Guácimo, Costa Rica: Universidad Earth.
- González, M. R. (2006). *Entre el Comal y la Olla, Fundamentos de Gastronomía Costarricense*. San José: EUNED.
- González-Hein, G. G. (2010). Detección de levaduras en cloaca de dos especies psitácidas nativas en un centro de rehabilitación en Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 2(2), 105-108.
- Grainger, K., & Tattersall, H. (2005). *Producción de Vino (Desde el Vid hasta la botella)*. España: Editorial Acribia, Zaragoza.
- Guaman, C., & Carvajal, J. (2009). Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. *Universitas. SCIENTIARUM*, 197-197.
- Gutierrez, L. A. (2007). *Caracterización Fisiológica de Levaduras Aisladas de la Filósfera de Mora*. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.
- Hernandez, A. (2003). *Microbiología Industrial*. Costa Rica: EUNED.

- Herrera, E. A. (2007). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivosestárter para la industria láctea y cárnica. *Universidad de Pamplona*, 1-12.
- Holt, J. G. (1994). *Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology* (Novena ed.). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- IICA-PROCIANDINO. (1995). *Experiencias en el cultivo del maiz en el area andina* (Vol. tercer). Quito-Ecuador: Prociandino.
- Illana, C. (2007). *El hongo Kombucha*. Madrid: Universidad de Alcalá.
- Janda, M., & Abbott, S. (2006). The Genus *Hafnia*: From Soups to Nuts. *Clinical Microbiology Reviews*, 12-28.
- Jiménez, R., González, N., Magaña, A., & Corona, A. (2012). *Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (Theobroma cacao) y coco (Cocos nucifera)*. Caracas: Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Kijac, M. B. (2003). *The South American table: The Flavor and Soul of Authentic Home Cooking From Patagonia to Rio de Janeiro, With 450 Recipes*. Boston, Massachusetts: The Harvard Common Press.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. Madrid: Panamericana.
- Kurtzman, J. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Boston: Elsevier Science
- Kumar, A., & Mishra, S. (2010). Studies on production of alcoholic beverages from some tropical fruits. *Indian J Microbiol*, 88-92.
- Lewin, A. (2012). *Real Food Fermentation*. Boston: Quarry.
- Linares, M. J., & Solis, F. (2007). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología*, 1-11.
- Llano Restrepo, M. C., & Capuzano Cifuentes, M. (1994). *La Chicha: Una bebida Fermentada a Travez de la Historia*. Colombia: Instituto Colombiano de Antropología e Historia.
- Long, J. (2003). *Conquista y Comida: Consecuencia del Encuentro de Dos Mundos*. Mexico D.F.: Universidad Autonoma de Mexico .
- López, E. (2014). *Caracterización físico - química y microbiológica de las bebidas fermentadas de la provincia de santo domingo de los tsáchilas*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.

- López, W., Ramírez, M., Mambuscay, A., & Osorio, E. (2010). Levaduras diversidad chicha identificación molecular biotecnología Yeasts diversity "chicha" molecular identification biotechnology. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 176-186.
- M. Garcia , R. Quintero , A. Lopez . (2004). *Biotecnología Alimentaria*. Mexico D.F.: Limusa S.A.
- Marcellino, N., Beuvier, E., Gueguen, M., & Benson, D. (2001). Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheesemaking Fabrications in France. *American Society for Microbiology*, 4752-4759.
- Medina, K., Ferreri, L., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., Gaggero, C., y otros. (2007). Aplicación de la levadura *hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *saccharomyces cervisiae* en la vinificación. *Enología N°2*, 1-6.
- Mendoza, M. (Enero-Junio de 2005). Importancia de la Identificación de Levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 103-117.
- Montiel, L. H., Peña, J. H., Aburto, M. L., & Diéguez, E. T. (2011). *CONTROL POSCOSECHA DE Geotrichum citri-aurantii EN LIMÓN MEXICANO (Citrus aurantifolia [Christm.] Swingle) MEDIANTE LEVADURAS MARINAS Y EPÍFITAS*. Baja California: Universidad y Ciencia Trópico Humedo.
- Montúfar, A. S. (2006). *Fiestas Folklóricas en la provincia de Imabura: Un Aporte al Desarrollo del País*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Muller, P. G., & Riel, R. (1990). *Tecnologías De America del Norte Para el procesamiento de Alimentos*. San Jose Costa Rica: IICA.
- Muñoz, E. (2001). *Biotecnología y Sociedad Encuentros y Desencuentros*. Madrid: Cambridge University Press.
- Negrete, N. (7 de Octubre de 2012). *La chicha de jora: identidad cultural y gastronómica*. Recuperado el 11 de marzo de 2014, de <http://www.elmercurio.com.ec/351923-la-chicha-de-jora-identidadcultural-y-gastronomica.htm>
- Negroni, M. (2009). *Aunque el término bacteria incluía tradicionalmente a todos los procariontes* (2da ed.). Buenos Aires: Panamerican.

- Núñez, A. E. (2008). Bacterias Productoras de Electricidad. *Actualidad SEM*, 34-45.
- Olivas, E., & Alarcón, L. R. (2004). *Manual de Prácticas de Microbiología básica, y Microbiología de Alimentos*. Ciudad Juárez, Chihuahua: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez.
- Organizacion de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. (1995). *El Sorgo y el Mijo en la Nutricion Humana*. Roma: FAO.
- Palacios, A., Krieger, S., Suarez, C., & Heras, J. (2009). La Fermentación Maloláctica: Objetivos Y variables de Control. *Mediorural*, 20-34.
- Parés, R., & Antonio, J. (2002). *Bioquimca de los Microorganismos*. Barcelona: Reverté S.A.
- Parés, R., & Juárez, A. (1997). *Bioquimica de los Microorganismos*. Barcelona: Reverté S.A.
- Pascual, A. M., & Calderón, V. (2000). *Microbiologia Alimentaria Metodologia Analítica Para Alimentos y Bebidas* (Segunda Edición ed.). Madrid: Diaz de Santos S.A.
- Pascual, G. S. (1999). *Abecedario de Dichos y Frases Hechas*. Madrid: EDAF S.A.
- Pazmiño, D. (2013). *Diversidad Microbiana Asociada a los procesos de fermentación de la chicha de arroz en la provincia de Bolivar*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Prats, G. (2007). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires: Panamericana.
- Prats, G., & Mirelis, B. (1998). *Género Shigella: Aspectos Prácticos para el laboratorio de Microbiología*. Barcelona: Hospital de Sant Pau.
- Prest, A., Hammond, J. R., & Stewart, G. (1994). Biochemical and Molecular Characterization of. *APPLIED AND ENVIRONMENT-AL MICROMBIOLOG*, 1635-1640.
- Ramírez, J. C., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce, F. (2011). Bacterias Lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la Salud. *Fuente*, 10-36.
- Ramírez, M., & Williams, D. E. (2003). *Guía Agro- Culinaria de Cotacachi, Ecuador y Alrededores*. Cali- Colombia: Feriva.

- Rivera, H. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las bebidas fermentadas elaboradas en la provincia de Tungurahua - Ecuador*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Rodriguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & Garcia, J. (2005). *Bacteriología General Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Samson, R., Hockstie, E., Frisvad, J., & Filtemberg, O. (1995). *Introduction to Food Borne Fungi* (Cuarta ed.). The Netherland: Ponsen Loogen.
- Santamarina Siurana, M. P., García Breijo, F. J., & Caselles, J. R. (1997). *Biología y Botánica Tomo II*. Valencia: Servicio de Publicaciones.
- Schwan, R. F., Almeida, E. G., Souza-Dias, M. A., & Jespersen, L. (2007). Yeast diversity in rice–cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazi. *FEMS Yeast Research*, 966-972.
- Solarte, C. (1991). *El manejo Indígena de la selva pluvial tropical Orientaciones para un desarrollo sostenido*. Roma-Italia: ABYA-YALA.
- Starr, C., & Taggart, R. (2008). *La Unidad y la Diversidad de la Vida 10ma Ed*. Mexico DF: Cengage Learning.
- Terán, J. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas de laprovincia de Imbabura*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Thanh, N. V., Hai, A. D., Takashima, M., & Lachance, M. A. (2012). *Moniliella carnis* sp. nov. and *Moniliella dehoogii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 3088-3094.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Micobiología*. Buenos Aires: Panamericana.
- Universidad Nacional Autónoma de México. (1985). *La Tecnología en el Mundo Andino* (Segunda ed.). Mexico D.F.: Direccion General de Publicaciones.
- Verlag, G. W. (1987). *Metodos de la Industria Quimica En Diagramas Coloreados*. Barcelona: Reverté S.A.
- Vicent, M. C., Alvarez, S., & Zaragoza, J. L. (2006). *Quimica Industrial Orgánica*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Villafañe, H. H. (2008). *Microbiología Básica Para el área de la salud y afines*. Medillín: Universidad de Antioquia.

Villagrán, C., & Castro, V. (2003). *Ciencia Indígena de los Andes del Norte de Chile*. Santiago de Chile : Universitaria S.A.

Villegas Ubidia, D. A. (2005). *Renovación de la Cocina Ecuatoriana Mediante la Cocina Fusión*. Quito: Universidad Tecnológica Equinoccial.

Yousef, A., & Carlstrom, C. (2006). *Microbiología de los alimentos* . Madrid : Acribia.

Zaragoza, R. (2007). *Microbiología aplicada al paciente crítico*. Buenos Aires: Panamericana.