



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA E
INDUSTRIAS**

CARRERA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS

**CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON
CAPACIDAD FERMENTATIVA EN EL PROCESO DE
ELABORACIÓN DE LA CHICHA DE UVA**

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

SANTIAGO XAVIER VELASCO PACHA

DIRECTORA: BIOQ. TERESA GUERRERO

Quito, agosto del 2016

© Universidad Tecnológica Equinoccial. 2016
Reservados todos los derechos de reproducción

FORMULARIO DE REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

PROYECTO DE TITULACIÓN

DATOS DE CONTACTO	
CÉDULA DE IDENTIDAD:	1723767735
APELLIDO Y NOMBRES:	Velasco Pacha Santiago Xavier
DIRECCIÓN:	Alangasí, calle Abdón Calderón # Oe1-251
EMAIL:	velasco.santiago1989@gmail.com
TELÉFONO FIJO:	022787357
TELÉFONO MOVIL:	0996581837

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha de uva
AUTOR O AUTORES:	Santiago Velasco
FECHA DE ENTREGA DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	30 de junio del 2016
DIRECTOR DEL PROYECTO DE TITULACIÓN:	Bioq. Teresa Guerrero
PROGRAMA	PREGRADO <input checked="" type="checkbox"/> POSGRADO <input type="checkbox"/>
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero de Alimentos
RESUMEN: Mínimo 250 palabras	<p>La elaboración de bebidas fermentadas, específicamente de la chicha, ha sido muy común desde hace varios siglos. Actualmente en Ecuador se conocen diversas variedades de chicha que se diferencian en la materia prima inicial y en el proceso de elaboración. La chicha de uva es una bebida tradicional del cantón Patate, provincia de Tungurahua, y constituye un símbolo del cantón. La presente investigación inició con el levantamiento de información con respecto a la elaboración de la chicha de uva y algunas características del cultivo de uvas en Patate; a continuación se preparó la bebida en la Planta Piloto de la carrera de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial. La chicha elaborada se colocó en kitsatos de vidrio y se mantuvo en una cámara de fermentación en el Laboratorio de Microbiología, para realizar el muestreo diario y análisis físico-químicos y microbiológicos durante el proceso fermentativo (días 1 al 4). Se realizaron recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes, mohos y levaduras, siendo las BAL las que se presentaron en</p>

	<p>mayor cantidad durante los 4 días de fermentación. Las BAL y las levaduras tuvieron su mayor recuento en el tercer día de fermentación (9.3 y 7.7 log UFC/ml, respectivamente). El crecimiento de coliformes se registró hasta el segundo día de fermentación y hubo un crecimiento bajo de mohos en los dos primeros días de fermentación. La caracterización de BAL y de levaduras se realizó mediante los kits API 50 CHL y API 20 C AUX, respectivamente. Con la ayuda del programa API WEB se lograron caracterizar 7 especies de BAL (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>Leuconostoc lactis</i>, <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i>, <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus pentosus</i>) y 9 especies de levaduras (<i>Candida guilliermondii</i>, <i>Candida famata</i>, <i>Trichosporon mucoides</i>, <i>Candida spherica</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida kefir</i>, <i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Candida utilis</i>). Esto ratifica la diversidad microbiana que existe en las bebidas fermentadas.</p>
<p>PALABRAS CLAVES:</p>	<p>Fermentación alcohólica, chicha, microbiología, dilución, recuento de microorganismos, colonias, aislamiento de microorganismos, acidez, pH, densidad, sólidos solubles</p>
<p>ABSTRACT:</p>	<p>Fermented beverages like “chicha” have been very common for several centuries. In Ecuador, there is a variety of “chichas” that differ from one another based on their initial raw material and production process. Grape chicha is a traditional drink from Patate, Tungurahua, and it has now become a symbol of this place. This investigation began with gathering information on the initial stage of preparing chicha grape and studying about the characteristics of growing grapes in Patate. The drink was later prepared in the Pilot Plant of Food Engineering Career which belongs to the Universidad Tecnológica Equinoccial. The elaborated chicha was placed in glass filter flasks and kept in a fermentation chamber in the Microbiology Laboratory, for daily sampling and physic-chemical and microbiological analysis during the fermentation process (days 1 to 4). Counts for lactic acid bacteria (LAB), coliforms, molds and yeasts were performed, with LAB presenting in greater quantities during the four days of fermentation. The LAB and yeast counts were mostly on the third day of fermentation (9.3 and 7.7 log CFU/ml respectively). Coliforms growth was recorded until the second day of fermentation and there was a low growth of mold on the first two days of fermentation. LAB and yeast characterization were performed using the API 50 CHL and API 20 C AUX kits,</p>

	<p>respectively. With the help of the API WEB program, seven (7) species of BAL (<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>Leuconostoc lactis</i>, <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus plantarum</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i>, <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus pentosus</i>) and nine (9) species of yeast (<i>Candida guilliermondii</i>, <i>Candida famata</i>, <i>Trichosporon mucoides</i>, <i>Candida spherica</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Candida tropicalis</i>, <i>Candida kefir</i>, <i>Cryptococcus laurentii</i> y <i>Candida utilis</i>) were characterized. This in fact confirms the microbial diversity in fermented beverages.</p>
<p>KEYWORDS</p>	<p>Alcoholic fermentation, chicha, microbiology, dilution, microbial count, microorganism colonies, microorganisms isolation, acidity, pH, density, soluble solids</p>

Se autoriza la publicación de este Proyecto de Titulación en el Repositorio Digital de la Institución.

f. 

VELASCO PACHA SANTIAGO XAVIER

172376773-5

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **VELASCO PACHA SANTIAGO XAVIER**, CI 172376773-5 autor del proyecto titulado: **Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha de uva** previo a la obtención del título de **INGENIERO DE ALIMENTOS** en la Universidad Tecnológica Equinoccial.

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tienen las Instituciones de Educación Superior, de conformidad con el Artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la BIBLIOTECA de la Universidad Tecnológica Equinoccial a tener una copia del referido trabajo de graduación con el propósito de generar un Repositorio que democratice la información, respetando las políticas de propiedad intelectual vigentes.

Quito, 30 de junio del 2016

f.  _____

VELASCO PACHA SANTIAGO XAVIER

1723767735

DECLARACIÓN

Yo **SANTIAGO XAVIER VELASCO PACHA**, 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.




Santiago Velasco

C.I.1723767735

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo que lleva por título “**Caracterización de microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha de uva**”, que, para aspirar al título de **Ingeniero en Alimentos** fue desarrollado por **Santiago Velasco**, bajo mi dirección y supervisión, en la Facultad de Ciencias de la Ingeniería e Industrias; y cumple con las condiciones requeridas por el reglamento de Trabajos de Titulación artículos 19, 27 y 28.



Bioq. Teresa Guerrero

DIRECTORA DEL TRABAJO

C.I. 1706052428

DEDICATORIA

Dedico el esfuerzo realizado para la culminación del presente trabajo a mis familiares, allegados y a todos quienes me han apoyado y han estado a mi lado en los momentos alegres y en las situaciones adversas que se me han presentado. Mención especial para mis padres que son quienes me han permitido llegar hasta donde estoy y han sabido aceptarme como soy. Los logros que he conseguido hasta el momento y los que, con el permiso y la bendición de Dios he de conseguir en el futuro, han sido y serán siempre pensando en mis padres, en mis abuelitos y en cada uno de los miembros de mi familia. Los amo a todos sin excepción alguna.

A Christian Chuquimarca: más que un amigo, mi hermano. Porque fue contigo con quien pasé momentos muy agradables e inolvidables de mi juventud. Tú sabes que siempre estarás presente en mi mente como una persona muy especial. Para ti también va dedicado este trabajo.

Sra. Isabelita. Que grato fue compartir con usted, parte de mi vida. Agradezco a Dios por el privilegio de conocerla y le ruego por su eterno descanso. Siempre la tengo y la tendré presente.

AGRADECIMIENTOS

A mi Padre celestial y a mi Virgencita del Quinche que me han sabido cuidar y acompañar durante cada segundo de mi vida. Sin sus bendiciones hoy no estaría aquí ni fuera la persona de bien que he sido hasta el momento. A ustedes me he encomendado y gracias a usted estoy dando un nuevo paso en mi vida. Eterna gratitud para con ustedes.

A mis padres por apoyarme en todo momento y colaborarme con lo que ha estado a su alcance. Todo lo que tengo es de ustedes y lo que he conseguido ha sido con su ayuda. Pese a que una vida entera no alcanzaría para compensar todo lo que me han brindado, el presente trabajo lo he realizado como una muestra del amor y agradecimiento que siento hacia ustedes.

Agradezco a mis hermanas por brindarme su apoyo y ayuda siempre que lo he necesitado. Así también al resto de mi familia por esos momentos tan hermosos que he pasado estando a su lado.

A todos los docentes que he tenido desde mi infancia por los conocimientos impartidos en clase y por sus sabios consejos. Agradecimientos especiales para mi directora de tesis, Bioq. Teresa Guerrero, así como también para la Ing. Nubia Grijalva, Bioq. María José Andrade e Ing. Fanny Argüello por guiarme en la realización del presente trabajo.

A mis compañeros de clase que me han acompañado durante el transcurso de mi ciclo estudiantil, especialmente a quienes me apoyaron durante el desarrollo de este trabajo y cuando requerí de su ayuda. Siempre es grato conocer nuevas personas.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 LA UVA (<i>Vitis vinifera</i> L.)	3
2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	3
2.1.2 PRODUCCIÓN MUNDIAL DE UVAS	5
2.1.3 PRODUCCIÓN DE UVAS EN EL ECUADOR	7
2.2 FERMENTACIÓN	8
2.2.1 DEFINICIÓN	8
2.2.2 USOS	9
2.2.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	10
2.2.4 VARIABLES DE CONTROL EN PROCESO DE FERMENTACIÓN	11
2.3 BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONALES	12
2.3.1 BEBIDAS TRADICIONALES A NIVEL MUNDIAL	12
2.3.2 BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONALES EN ECUADOR	15
2.4 CHICHA DE UVA	17
2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES	17
2.5 MICROBIOLOGÍA DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS	19
2.5.1. PRINCIPALES MICROORGANISMOS FERMENTADORES	19
3. METODOLOGÍA	29
3.1 LEVANTAMIENTO DE INFORMACIÓN	29
3.2 ELABORACIÓN DEL PRODUCTO	29
3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	30
3.3.1 TOMA DE MUESTRAS	30
3.3.2 DILUCIONES SUCESIVAS	31
3.3.3 SIEMBRA EN PLACA PARA RECuento DE MICROORGANISMOS	31
3.3.4 RECuento MICROBIANO	32
3.3.5 AISLAMIENTO DE BAL Y LEVADURAS	33
3.4 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS	34

	PÁGINA
3.4.1 CARACTERIZACIÓN DE BAL	34
3.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS	35
3.5 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICO QUÍMICAS DE LA CHICHA DE UVA	35
3.5.1 DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ	35
3.5.2 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD	36
3.5.3 DETERMINACIÓN DEL pH	37
3.5.4 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES	38
3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 RECIENTOS MICROBIANOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE UVA	39
4.1.1 RECIENTOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)	39
4.1.2 RECIENTOS DE LEVADURAS	40
4.1.3 RECIENTOS DE COLIFORMES	41
4.1.4 RECIENTO DE MOHOS	42
4.2 ANÁLISIS FISICO QUÍMICOS	42
4.2.1 ACIDEZ	42
4.2.2 DENSIDAD	43
4.2.3 pH	44
4.2.4 SÓLIDOS SOLUBLES	46
4.3 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE CHICHA DE UVA	47
4.3.1 AISLAMIENTO DEL BAL Y LEVADURAS	47
4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE BAL	48
4.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS	50
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53
5.1 CONCLUSIONES	53
5.2 RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la uva	3
Tabla 2. Producción mundial de la uva	6
Tabla 3. Bebidas tradicionales por continentes	14
Tabla 4. Hongos de importancia industrial	25
Tabla 5. Contaminación bacteriana de los alimentos	28
Tabla 6. Materiales y equipos utilizados para la elaboración de chicha de uva	30
Tabla 7. Medios de cultivo utilizados y condiciones de incubación	32
Tabla 8. Rango de aceptación de microorganismos	33
Tabla 9. Características fenotípicas de BAL	47
Tabla 10. Características fenotípicas de levaduras	48
Tabla 11. Especies de bacterias caracterizadas en la chicha de uva	49
Tabla 12. Especies de levaduras caracterizadas en la chicha de uva	51

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Variedad de uva Moscatel Rosada	4
Figura 2. Porcentaje de la producción mundial de uva por tipo de producto	6
Figura 3. Factores de control en el proceso de fermentación	12
Figura 4. Proceso de elaboración de la chicha de uva	18
Figura 5. Estructura típica de una levadura	19
Figura 6. Formas típicas de las levaduras	20
Figura 7. Descripción de los grupos de cocos de interés en alimentos	23
Figura 8. Aislamiento por estrías cada 45°	33
Figura 9. Cinética microbiana registrada en el proceso fermentativo de la chicha de uva	39
Figura 10. Acidez durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva	43
Figura 11. Densidad durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva	44
Figura 12. pH durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva	45
Figura 13. Sólidos solubles durante el período de fermentación para obtención de chicha de uva	46

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I.	
PREPARACIÓN DE LA CHICHA DE UVA	63
ANEXO II.	
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	64
ANEXO III.	
RECuento DE BAL, LEVADURAS Y COLIFORMES	65
ANEXO IV.	
AISLAMIENTO DE BAL Y LEVADURAS	66
ANEXO V.	
CARACTERIZACIÓN DE BAL Y LEVADURAS CON EL KIT API	66
ANEXO VI.	
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS. DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ	68
ANEXO VII.	
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD	69
ANEXO VIII.	
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS. DETERMINACIÓN DEL pH	70
ANEXO IX.	
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS DETERMINACIÓN SÓLIDOS SOLUBLES	71

	PÁGINA
ANEXO X.	
TABLA DE RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA CHICHA DE UVA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN (log UFC/ml)	72
ANEXO XI.	
TABLA DE RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS DE LA CHICHA DE UVA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN	73
ANEXO XII.	
TABLA RESUMEN DE LA CARGA MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE UVA	74
ANEXO XIII.	
TABLA RESUMEN DE ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS EVALUADOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE CHICHA DE UVA	74

RESUMEN

La elaboración de bebidas fermentadas, específicamente de la chicha, ha sido muy común desde hace varios siglos. Actualmente en Ecuador se conocen diversas variedades de chicha que se diferencian en la materia prima inicial y en el proceso de elaboración. La chicha de uva es una bebida tradicional del cantón Patate, provincia de Tungurahua, y constituye un símbolo del cantón. La presente investigación inició con el levantamiento de información con respecto a la elaboración de la chicha de uva y algunas características del cultivo de uvas en Patate; a continuación se preparó la bebida en la Planta Piloto de la carrera de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial. La chicha elaborada se colocó en kitsatos de vidrio y se mantuvo en una cámara de fermentación en el Laboratorio de Microbiología, para realizar el muestreo diario y análisis físico-químicos y microbiológicos durante el proceso fermentativo (días 1 al 4). Se realizaron recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes, mohos y levaduras, siendo las BAL las que se presentaron en mayor cantidad durante los 4 días de fermentación. Las BAL y las levaduras tuvieron su mayor recuento en el tercer día de fermentación (9.3 y 7.7 log UFC/ml, respectivamente). El crecimiento de coliformes se registró hasta el segundo día de fermentación y hubo un crecimiento bajo de mohos en los dos primeros días de fermentación. La caracterización de BAL y de levaduras se realizó mediante los kits API 50 CHL y API 20 C AUX, respectivamente. Con la ayuda del programa API WEB se lograron caracterizar 7 especies de BAL (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus pentosus*) y 9 especies de levaduras (*Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida kefir*, *Cryptococcus laurentii* y *Candida utilis*). Esto ratifica la diversidad microbiana que existe en las bebidas fermentadas.

ABSTRACT

Fermented beverages like “chicha” have been very common for several centuries. In Ecuador, there is a variety of “chichas” that differ from one another based on their initial raw material and production process. Grape chicha is a traditional drink from Patate, Tungurahua, and it has now become a symbol of this place. This investigation began with gathering information on the initial stage of preparing chicha grape and studying about the characteristics of growing grapes in Patate. The drink was later prepared in the Pilot Plant of Food Engineering Career which belongs to the Universidad Tecnológica Equinoccial. The elaborated chicha was placed in glass filter flasks and kept in a fermentation chamber in the Microbiology Laboratory, for daily sampling and physico-chemical and microbiological analysis during the fermentation process (days 1 to 4). Counts for lactic acid bacteria (LAB), coliforms, molds and yeasts were performed, with LAB presenting in greater quantities during the four days of fermentation. The LAB and yeast counts were mostly on the third day of fermentation (9.3 and 7.7 log CFU/ml respectively). Coliforms growth was recorded until the second day of fermentation and there was a low growth of mold on the first two days of fermentation. LAB and yeast characterization were performed using the API 50 CHL and API 20 C AUX kits, respectively. With the help of the API WEB program, seven (7) species of BAL (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus pentosus*) and nine (9) species of yeast (*Candida guilliermondii*, *Candida famata*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Cryptococcus laurentii* y *Candida utilis*) were characterized. This in fact confirms the microbial diversity in fermented beverages.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Los principales atractivos turísticos del Ecuador son su flora, su fauna y su exuberante y variada gastronomía. La comida típica nacional ha generado gran interés y demanda en las personas que visitan el país. Según Galindo (2012), los platos típicos de antaño transmitidos de generación en generación forman parte de los atractivos turísticos que generan una alta demanda por parte de los turistas locales y, especialmente, de los extranjeros.

Entre los hábitos y prácticas que se mantienen en el país, se encuentra la elaboración de bebidas tradicionales entre las que se puede citar a los diferentes tipos de chichas, el chaguarmishqui y el guarapo, como las más conocidas.

El término chicha se utiliza para designar a una serie de bebidas obtenidas por fermentación no destilada del maíz u otros cereales autóctonos del continente americano, o de frutas como la manzana o la uva (Simunovic, 2010).

La chicha de uva es una bebida propia de la provincia de Tungurahua. Su elaboración y consumo es muy común en las fiestas y celebraciones de las comunidades. La preparación de esta bebida ha tomado importancia, especialmente en el cantón Patate, cuyos moradores han sabido aprovechar la disponibilidad de uva de calidad que existe en el lugar (Moreta, 2014).

El estudio de la caracterización de los microorganismos que intervienen en el proceso fermentativo de la chicha de uva se plantea como una alternativa para obtener nuevas cepas de microorganismos fermentadores, a partir de análisis microbiológicos de esta bebida, en las diferentes etapas del proceso de fermentación.

El objetivo general de este trabajo de investigación fue caracterizar los microorganismos con capacidad fermentativa en el proceso de elaboración de la chicha de uva y se plantearon como objetivos específicos:

- Elaborar la chicha de uva tradicional de la provincia de Tungurahua, cumpliendo con estándares de calidad.
- Realizar recuentos de microorganismos fermentadores (levaduras y bacterias ácido lácticas) y de microorganismos alterantes (mohos y coliformes totales) en las 3 etapas (inicial, fermentativa y final) del proceso de elaboración de la chicha de uva.
- Aislar y caracterizar los microorganismos fermentadores (levaduras y bacterias ácido lácticas) presentes en el proceso fermentativo de la chicha de uva.

2. MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA UVA (*Vitis vinifera* L.)

2.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Bajo el término de uva se conoce al fruto de la vid (*Vitis vinifera* L.), que presenta una forma casi redonda, es terso y algo translúcido. Esta fruta nace apiñada a otros granos y adheridos todos a un vástago común, dando forma a los racimos. Cada grano tiene una piel delgada (hollejo) en cuyo interior se encuentran dos o más semillas duras y una pulpa delicada y jugosa de la cual se extrae el mosto (Dorado & López, 2011).

Desde el punto de vista botánico, la vid tiene la clasificación taxonómica que se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la uva

Tipo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Fanerógama	Angiosperma	Ramnida	Ampelidácea	<i>Vitis</i>	<i>vinifera</i> L.

(Álvarez, 2011).

La variedad de uva que se utiliza en la ciudad de Ambato para la elaboración de la chicha de uva es la conocida como Rosa Moscatel de Curtiduría o Moscatel Rosada, misma que se muestra en la Figura 1. Esta variedad corresponde a una de las más de 200 existentes.



Figura 1. Variedad de uva Moscatel Rosada
(Exportadora Subsole, 2010).

La vid es un arbusto extremadamente resistente, que necesita muy poca agua y elementos minerales, capaz de soportar condiciones climatológicas extremas por lo que puede plantarse en todo tipo de terreno. Dichas condiciones pueden ir de los $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin sufrir seriamente por ello (Delgado, 2014).

La vid puede ser capaz de vivir entre 25 y 40 años en producción, de acuerdo con el tipo de planta, el sitio de cultivo y el clima. En términos generales, su época de producción inicia luego del cuarto año de ser sembrada, siendo el séptimo u octavo los años en los que se obtiene un fruto de óptima calidad (Álvarez, 2011).

Sus racimos son alargados pero pequeños con bayas de diferentes tamaños, redondas y de color rosado oscuro o morado, cuyo peso oscila entre los 600 y 700 gramos. Para la cosecha se debe observar que la fruta presente una coloración uniforme o que su contenido de azúcar se encuentre entre los 10 y $17\text{ }^{\circ}\text{Brix}$, de acuerdo con el destino que se va a dar a la fruta (Muñoz & Valenzuela, 2013).

La uva es una fruta altamente refrescante debido a su alto contenido de agua, la misma que representa el 80 % del total de la fruta. Se halla constituida por un 15 a 17 % de carbohidratos. Su contenido de vitaminas B6 y B9 favorece el metabolismo de los aminoácidos. El potasio presente en la uva permite una adecuada función celular. Los fitonutrientes (antocianinas,

flavonoides y taninos) son los responsables del color, aroma y textura de la fruta. De entre los flavonoides vale destacar la presencia del resveratrol en la piel de la fruta, que ayuda a inhibir células cancerígenas y ejerce cierto efecto sobre el control de peso (Freya, 2013; EXPOFRUT, 2013).

El zumo extraído de la uva contiene glucosa y fructosa, además de ciertos ácidos, taninos y elementos nitrogenados. Debido a su contenido de azúcar, agua y levaduras, las uvas pueden cumplir con el proceso de fermentación de forma natural. Las levaduras se hallan formando la cubierta de la fruta (pelusa) sobre la piel. Existen, tanto levaduras necesarias para la fermentación como levaduras naturales. Al extraer el jugo de las uvas por trituración a escala industrial se añaden sulfitos a una concentración tal que se elimina las levaduras indeseables y al mismo tiempo se protege a las levaduras deseables para la conversión de azúcares en alcohol (Ordóñez, 2008).

2.1.2 PRODUCCIÓN MUNDIAL DE UVAS

La importancia del cultivo de uva es tan grande que basta mencionar que la uva probablemente representa el fruto de mayor cultivo en el mundo (Ordóñez, 2008). Los resultados de las investigaciones indican que, en el 2014, la producción mundial de uvas destinadas para todos los usos (uvas de mesa, vinos, zumos, entre otras.) fue de 73 700 millones de kilos (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2015).

Como se puede observar en la Tabla 2, Europa es el continente de mayor producción de uvas a nivel mundial; sin embargo, al realizar un análisis de cada país, China es el de mayor producción a nivel global; la producción de uvas en China bordea los 11 100 millones de kg anuales. Estados Unidos es el segundo mayor productor de uvas con 7 000 millones de kg de fruta. Francia e Italia van a la par con una producción de 6 900 millones de kg (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2015).

Tabla 2. Producción mundial de la uva

Producción mundial de uva (millones de kilogramos)						Por tipo de productos en 2014		
	2010	2011	2012	2013	2014	Uvas frescas	Uvas secas	Uvas para vinos
CHINA	8 651	9 175	10 643	11 650	11 102	8 468	42	1 481
EEUU	6 791	6 456	6 831	7 834	7 047	721	320	2 955
FRANCIA	5 855	6 589	5 337	5 485	6 943	44	-	6 188
ITALIA	7 787	7 116	6 918	8 010	6 843	1 038	-	5 928
ESPAÑA	6 119	5 695	5 331	7 646	6 231	288	4	5 063
TURQUÍA	4 255	4 296	4 185	4 017	4 175	1 891	430	82
CHILE	2 544	2 954	3 200	3 362	2 791	7 758	93	1 391
ARGENTINA	2 716	3 006	2 366	2 872	2 689	13	18	2 014
INDIA	807	1 235	2 485	2 585	2 602	2 195	34	23
IRAN	2 255	2 113	2 150	2 046	2 174	1 356	160	...
Producción Total	67 002	69 133	70 028	77 678	73 673	24 768	1 306	35 775

(Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2015).

Un porcentaje del total de uva cultivada se utiliza para el consumo directo de las personas. La mayor parte está destinada a la elaboración de bebidas naturales, alcohólicas o fermentadas (Ordóñez, 2008). Esto debido a los beneficios económicos que se obtiene al industrializar la fruta. Se estima que la producción de uvas para vinos representa un 55 % del total de uvas cultivadas (40 535 millones de kg, aproximadamente), mientras que las uvas destinadas al consumo directo representan el 35 %. El porcentaje restante del total de cultivos de uva es destinado a la producción de uvas secas (8 %) y de zumos o procesos intermedios (2 %) Estos datos se representan en la Figura 2 (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2015).

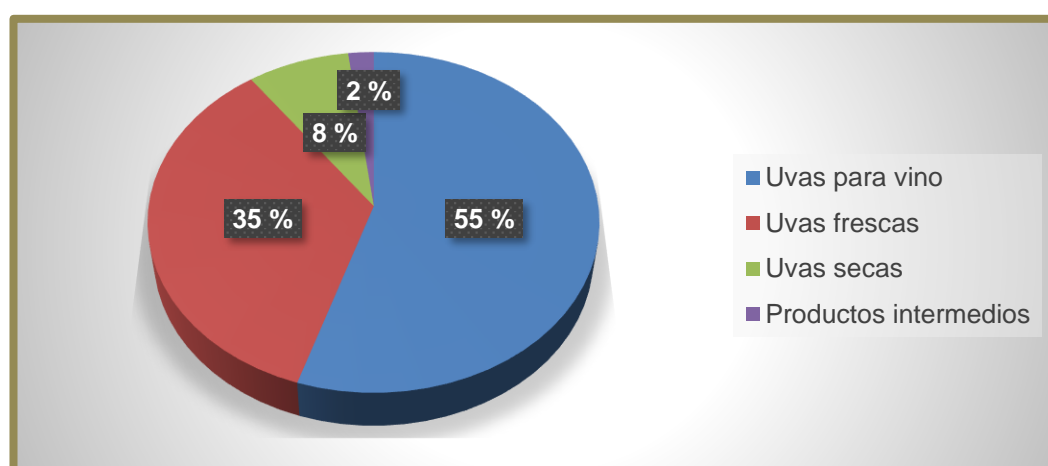


Figura 2. Porcentaje de la producción mundial de uva por tipo de producto
(Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2015)

2.1.3 PRODUCCIÓN DE UVAS EN EL ECUADOR

En Ecuador también existe gran acogida de la uva. Al ser una fruta mundialmente conocida, accesible y de agradable sabor, su consumo está dirigido para toda clase de personas. Pese a que en Ecuador la uva es una de las frutas de mayor consumo, fáciles de adquirir y que se puede encontrar a diario en la mayoría de hogares, la producción nacional de uvas es muy baja con respecto a su consumo.

Según el Banco Central del Ecuador, la demanda de uva en Ecuador es de aproximadamente 600 hectáreas o, de manera más explícita, 16 millones de kg anuales. Este dato es corroborado por una publicación de Diario El Telégrafo (2014), en la que se indicó que: “Si en el Ecuador se llegare a cultivar 300 hectáreas de uvas se lograría cubrir el 47 % de la demanda interna y evitar la salida de alrededor de 12 millones de divisas”; sin embargo, no se indica la cantidad real de uvas cultivadas hasta el momento.

Se estima que el déficit interno bordea los 4 millones de kilos (Freire, 2002). Entre los principales aspectos que influyen en esta insuficiente producción de uvas se encuentran la falta de recursos económicos para la inversión en terrenos y tecnología de punta y los insuficientes conocimientos que tienen los agricultores respecto al manejo eficiente de sus huertos (Yáñez, 2011).

Para el caso específico de la provincia de Tungurahua los dos grandes aspectos que contribuyeron a la reducción de los cultivos de uva fueron:

- Los problemas concernientes a la adulteración de bebidas alcohólicas registrados en el año 2011, lo cual provocó una notable reducción en el consumo de vinos y por ende, una menor demanda de uvas.
- La constante actividad eruptiva del volcán Tungurahua.

Según Soria (2015), propietario de un local artesanal en Patate llamado “Vinos y Licores de Samuel”, estos factores ocasionaron que los cultivos de uva del sector se reduzcan de 50 a tan solo 6 hectáreas que existen actualmente.

2.2 FERMENTACIÓN

2.2.1 DEFINICIÓN

La oxidación aerobia y anaerobia de la glucosa ocurre de la siguiente manera: en presencia de oxígeno la mayoría de los organismos son capaces de degradar carbohidratos, lípidos y aminoácidos por oxidación. Ante la ausencia de oxígeno, los organismos utilizan la glucosa para obtener ATP; este proceso se realiza a partir de la reducción de piruvato en lactato para el caso de las células animales, mientras que en los microorganismos la regeneración del NAD^+ puede ocurrir de diversas maneras a partir del proceso conocido como fermentación (Koolman & Röhm, 2009).

Etimológicamente, la palabra fermentación proviene del latín *fervere* que significa ebullición. Dicho nombre se atribuye a que, durante el proceso de fermentación, el líquido es agitado por las burbujas de dióxido de carbono, dándole un aspecto espumoso o de ebullición (Ordóñez, 2008).

Desde el punto de vista bioquímico la fermentación es un proceso mediante el cual las sustancias orgánicas o sustratos sufren una serie de transformaciones bioquímicas, ya sea de oxidación o reducción, obteniéndose una ganancia de energía que es aprovechada por microorganismos. En este ámbito se excluye la presencia de oxígeno durante el proceso de fermentación (Hernández, 2010).

En microbiología, se utiliza la palabra fermentación para referirse a la transformación de compuestos orgánicos a partir de enzimas microbianas, las cuales son responsables de la degradación de sustratos con la consecuente obtención de metabolitos o biomasa. Este proceso puede ocurrir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Hernández, 2010).

En términos generales, la fermentación es un proceso lento de cambio o descomposición de sustancias orgánicas, producido por la acción de microorganismos denominados fermentos (levaduras, bacterias o mohos).

Según sean los productos formados, las fermentaciones reciben diversos nombres; entre las principales figuran la alcohólica, la láctica, la acética y la butírica (López, 2011).

Desde el punto de vista energético las fermentaciones son muy poco rentables si se comparan con la respiración, ya que a partir de la molécula de glucosa solo se obtienen 2 moléculas de ATP, mientras que en la respiración se producen 36 moléculas de ATP. Esto se debe a que parte de esta energía tiende a quedarse en los alcoholes y ácidos que se liberan al final; sin embargo, las fermentaciones desempeñan un papel de importancia vital en la vida de muchas células (López, 2011).

La fermentación y su resultado final dependen del tipo de microorganismo que la lleva a cabo, de la naturaleza del sustrato fermentable y de factores ambientales como la temperatura y el pH. El proceso puede ocurrir de manera natural cuando las condiciones ambientales permiten la interacción de los microorganismos y los sustratos orgánicos susceptibles; o puede ser llevado a cabo de manera artificial, cuando el hombre propicia las condiciones y el contacto requerido (Koneman & Allen, 2012).

2.2.2 USOS

El beneficio industrial principal obtenido del proceso de fermentación es la conversión de mosto en vino, cebada en cerveza y carbohidratos en CO₂ para hacer pan. La fermentación de los alimentos cumple varios propósitos:

1. Eliminación de texturas y sabores desagradables.
2. Incremento en el tiempo de conservación de alimentos a través de la producción de ácido láctico, ácido acético y etanol.
3. Formación de nutrientes importantes o eliminación de compuestos que inactivan el efecto de dichos nutrientes.
4. Mejoramiento de las propiedades de los productos (alimentos más digeribles).

5. Inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y de la producción de toxinas.
6. Reducción considerable en el tiempo de cocción de los alimentos y ahorro de energía (Jay, Loessner, & Golden, 2009).

En general, las fermentaciones son de gran importancia ecológica porque muchos microorganismos reciclan la materia orgánica a partir de este proceso. También se obtienen algunos antibióticos y el petróleo que es muy utilizado como combustible fósil (García, Quintero, & López-Munguía, 2013).

2.2.3 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Se puede definir a la fermentación alcohólica como aquel proceso bioquímico que permite la transformación, en condiciones anaerobias, de un líquido o zumo azucarado en etanol o alcohol etílico debido a la acción de microorganismos fermentadores presentes en frutas, verduras o cereales (García, 2008; Hernández & Martínez, 2012; Sadava, 2008).

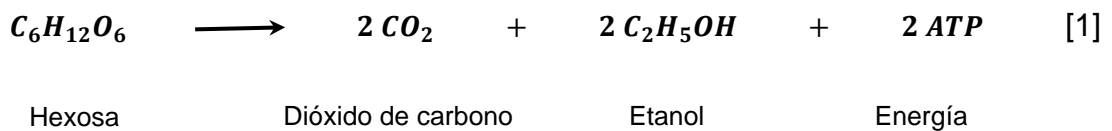
Actualmente, la ingeniería genética ha permitido desarrollar microorganismos fermentadores en el laboratorio; sin embargo, esto ha sido posible gracias a los estudios llevados a cabo a partir de la fermentación tradicional (Vincent, Álvarez, & Zaragoza, 2010).

Para que tenga lugar la fermentación alcohólica es necesario que los microorganismos dispongan de un sustrato con alto contenido de carbohidratos (glucosa, fructosa, sacarosa, almidón, entre otros.) para obtener cantidades considerables de etanol, dióxido de carbono y moléculas de ATP, necesarias para obtener energía (Hernández & Martínez, 2012).

La descomposición anaerobia de la glucosa en etanol es llevada a cabo por la acción de las levaduras (López, 2011). *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más conocida; fue el primer eucarionte cuyo genoma se secuenció completamente y ahora es utilizada como organismo modelo. Bajo

condiciones anaerobias la levadura convierte el piruvato en etanol y CO₂. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras forman un entorno favorable para su desarrollo en el que los microorganismos competidores del sustrato tienden a desaparecer (García, 2008).

De la fermentación de una molécula de glucosa se obtiene como resultado dos moléculas de anhídrido carbónico y dos de alcohol etílico (Ecuación 1):



Con respecto a su uso industrial, el etanol resultante de este tipo de fermentación se utiliza en la elaboración de bebidas alcohólicas tales como el vino, la cerveza, la sidra y el cava. Durante los últimos años se ha empezado a sintetizar etanol mediante la fermentación a gran escala para ser empleado como biocombustible (García, 2008).

2.2.4 VARIABLES DE CONTROL EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

Considerando la importancia de tener un producto fermentado de buena calidad, es necesario evaluar ciertos aspectos o condiciones que influyen en la fermentación alcohólica. Si bien este proceso ocurre de manera espontánea, a escala industrial se controlan ciertos parámetros físico químicos que influyen en la fermentación, con el propósito de optimizar procesos, aumentar la calidad del producto, reducir tiempos de producción y evitar pérdidas de producto que generan egresos para la empresa.

En la Figura 3 se detallan las principales variables de control a considerar durante el proceso de fermentación.

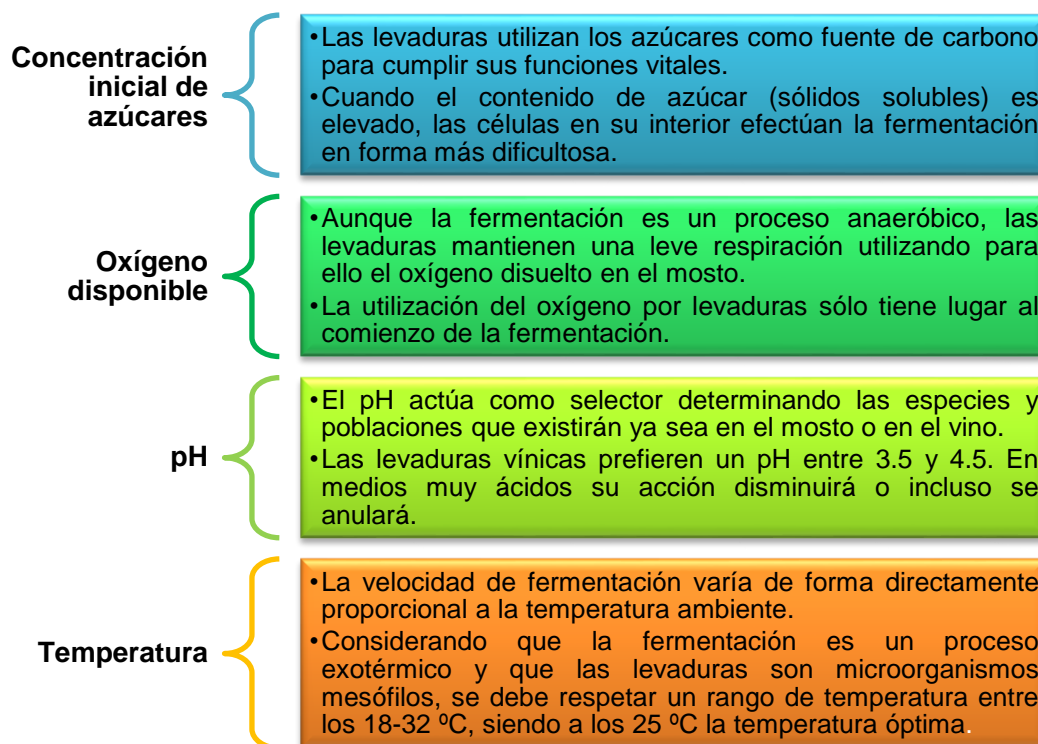


Figura 3. Factores de control en el proceso de fermentación
(Sáez, 2014; Guevara, 2013; Ramírez & Pedroza, 2011; Collado, 2009).

2.3 BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONALES

2.3.1 BEBIDAS TRADICIONALES A NIVEL MUNDIAL

Hablar de bebidas fermentadas tradicionales es hablar de la historia, costumbres y creencias propias de una nación, de un país, de un pueblo o grupo social. Es uno de los aspectos que identifica a un país y que lo hace más atractivo e interesante para los turistas.

Las bebidas tradicionales se han venido elaborando desde hace muchos años atrás. Algunas de estas se mantienen hasta la actualidad; sin embargo, su elaboración es cada vez menos habitual debido al desarrollo de nuevos productos de “consumo inmediato” que requieren muy poco o ningún tratamiento previo a su consumo.


Según datos históricos, los primeros alimentos fermentados fueron las bebidas alcohólicas, que podrían haber existido desde hace aproximadamente 20 000 años Antes de Nuestra Era (ANE). A partir de éstas, se han venido desarrollando los diferentes alimentos fermentados que en la actualidad se conoce (Álvarez, 2012).

Conceptualmente el término de alimento fermentado hace referencia a aquellos productos en cuyo proceso de elaboración han tomado parte ciertos microorganismos que contribuyen al metabolismo o descomposición del mismo (García, 2008). Por su parte, las bebidas tradicionales son aquellas que han sido elaboradas de manera artesanal para su consumo individual y/o para su comercialización y que, generalmente, se elaboran en ocasiones especiales razón por la cual son conocidas y consumidas a nivel regional o local (García, Quintero, & López-Munguía, 2013).



Las bebidas tradicionales son saludables por no contener productos químicos que alteren el sistema inmune, no requieren la utilización de instrumentos tecnificados o materiales costosos, poseen un sabor único agradable al paladar de las personas y aportan a la interculturalidad y economía de un país (Berruecos, 2007).

En la Tabla 3 se mencionan ciertas bebidas que, a criterio personal, se consideran las más relevantes a nivel mundial referenciándolas por continentes.

Tabla 3. Bebidas tradicionales por continentes

CONTINENTE	BEBIDA	CARACTERÍSTICAS
<p style="text-align: center;">AMÉRICA</p> 	<p>1. Bloody Caesar</p>	<p>Es una bebida muy común en los pueblos canadienses. Se trata de un coctel hecho a partir de vodka mezclado con clamato y salsas de tabasco e inglesa.</p>
	<p>2. Pulque</p>	<p>Es la bebida tradicional de la población de Tlaxcala de México. El pulque es el néctar que se obtiene del manguely que ha sido fermentado por cierto tiempo. De acuerdo al tipo de pulque se puede mezclar con limón, piña, melón o guayaba.</p>
	<p>3. Guarapo</p>	<p>El guarapo es una bebida muy popular en latinoamérica. Cada país tiene su propia receta. Se extrae el jugo de la caña azucarera, se mezcla con agua, se pone a hervir; luego de que se haya enfriado se deja fermentar por 3 días.</p>
	<p>4. Chicha</p>	<p>Se la podría considerar como la bebida símbolo de Sudamérica. Pese a que existen mas de 100 variedades de chichas a nivel mundial, sus principales ingredientes son: agua; cereales, frutas o tubérculos; esencias (saborizantes) y endulzantes.</p>
<p style="text-align: center;">ÁFRICA</p> 	<p>1. Umqombothi</p>	<p>Es una bebida artesanal sudafricana hecha a base de maíz, malta, zahína, agua y levadura. Tiene un sabor amargo, color opaco y consistencia cremosa.</p>
	<p>2. Tej</p>	<p>Se trata de un vino hecho con agua, miel y hojas de gesho (planta Africana). El tej podría haber sido uno de los primeros fermentos elaborados por el hombre. Su contenido alcohólico varía del 5 al 30 %.</p>
	<p>3. Chibuku</p>	<p>Es una bebida alcohólica consumida en Zambia Sudáfrica, Bostwana y Malawi. Su vida útil es de 5 días y el proceso de fermentación continúa en el envase. Se la conoce como “<i>Shake, Shake</i>”.</p>
	<p>4. Kunu</p>	<p>Es una bebida tradicional en el país nigeriano. Se elabora a partir del mijo o sorgo para luego ser mezclado con batata y jengibre. Algunas recetas remplazan los granos mencionados por el maíz.</p>

Continuación...

CONTINENTE	BEBIDA	CARACTERÍSTICAS
<p style="text-align: center;">ASIA</p> 	1. Soju	Es una bebida con un contenido alcohólico que va del 19.5 al 20.1 %. Puede ser elaborado con arroz, trigo, cebada, tapioca o patatas.
	2. Sake	Sus 22 grados de contenido alcohólico hacen que sea considerada como la bebida fermentada natural con mayor grado alcohólico. El sake es una bebida de antaño hecha con arroz cocido, una especie de esporas llamadas “ <i>koji-kin</i> ” y otros 50 ingredientes más.
	3. Tuba	También conocida en la India como “ <i>kalu</i> ”. Su nombre hace referencia a la savia de la palmera que luego de ser fermentada, se la mezcla con betabel y con trozos de frutas para mejora su sabor.
<p style="text-align: center;">EUROPA</p> 	1. Apfelwein	Se utilizan manzanas secas y muy ácidas. El zumo obtenido se deposita en grandes barriles y se deja fermentar por 4-6 meses. Su contenido alcohólico es menor al 6 %.
	2. Grappa	Es una bebida italiana que se obtiene de los residuos de la fermentación del vino de uva. Se utiliza la pulpa de la uva íntegramente. Tiene un 45 % de graduación alcohólica y se la puede fabricar con peras o ciruelas.
	3. Absenta	Es un licor elaborado con hierbas de ajeno, coriandro, anís e hinojo. El ajeno es una de las hierbas más amargas conocidas por lo que se añade gran cantidad de azúcar. Se la conoce como “ <i>Fée Verte</i> ” debido al poder alucinógeno que ocasionan sus 55 a 89 °G.L de alcohol.

(Chiodi, 2013; El Universal, 2010; Gisbert, 2014; Hidalgo, 2013; Hoyer, 2012; Lozano, 2014; Machuca, 2013; Rodríguez, 2010; Rodríguez, S. 2016; Saavedra 2012; Varise, 2011; Veintimilla, 2015; Velásquez & Jiménez, 2012)

2.3.2 BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONALES EN ECUADOR

Desde el inicio de su historia, Ecuador se ha caracterizado por ser un país dedicado a la caza, a la pesca, a la agricultura y a la ganadería. Fruto de estas actividades han surgido un sinnúmero de alimentos procesados que existen actualmente.

El maíz es quizás el primer grano aprovechado por nuestros antepasados, para su consumo como tal o como un producto derivado de este grano. Del aprovechamiento del maíz surgió la bebida milenaria que hasta la actualidad se consume y que, pese a no ser originaria del Ecuador, se ha convertido en el símbolo de varios pueblos y comunidades indígenas. Se trata de la tradicional chicha de maíz.

La chicha es, sin duda, la bebida fermentada tradicional más conocida, consumida y elaborada por los ecuatorianos. De acuerdo a Salazar (2015), el consumo de esta bebida podría remontarse a quienes serían los primeros pobladores ecuatorianos, es decir, a la cultura Valdivia. Salazar (2015) detalla que se han encontrado residuos de maíz dentro de las vasijas de barro pertenecientes a esta cultura. Sin embargo, como referencia más plausible se señala que fue en la época colonial cuando uno de los habitantes logró degustar una bebida similar a la chicha obtenida al mezclar las cosechas de maíz con el agua de lluvia, hecho que ocurrió durante el reinado de Túpac Yupanqui. Desde entonces dicho elixir se ha venido preparando y perfeccionado (Rosas, 2012).

Existe un tipo de chicha por cada provincia (Salazar, 2015); la chicha más antigua es la conocida como chicha de jora. Se denomina jora a la harina obtenida del proceso de germinación, tostado y molienda del maíz (Aguirre, 2013). El contenido alcohólico de las bebidas fermentadas depende del tiempo de fermentación. Es así que, el etanol en la chicha aumenta un grado por cada día de fermentación (Veintimilla, 2015).

Además de la chicha de jora, en Ecuador son muy populares la chicha del Yamor, la chicha de yuca, la chicha de arroz, la chicha de avena, el guarapo y el chaguarmishqui. A partir de estas bebidas se han elaborado muchas otras bebidas que varían en el tipo de fruta, cereal o tubérculo utilizados.

2.4 CHICHA DE UVA

2.4.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES

La chicha de uva es una bebida típica del cantón Patate, en la provincia de Tungurahua. En este cantón se trata de aprovechar la producción de viñedo que poseen los pequeños agricultores del sector. Con esto se busca dar un valor agregado a la fruta y llamar la atención de los turistas nacionales y extranjeros. Esta actividad es muy rentable para la comunidad de Patate, especialmente para quienes cuentan con viñedos propios. De una cantidad aproximada de 1 libra de uvas, 2 litros de agua y 500 g de azúcar se obtiene alrededor de 16 vasos de chicha de uva (Mejía, 2013).

La chicha de uva se caracteriza por ser una bebida color vino de sabor agradable y con un contenido alcohólico entre 3 y 5 °GL. Según los pobladores del sector esta bebida se ha venido elaborando desde hace más de 100 años. Entre las diversas variedades de chichas que se elaboran en el Ecuador, esta es una de las más sencillas y no es necesario contar con materiales rústicos ni con equipos tecnificados (Moreta, 2014).

Los pobladores y clientes en general, consumen la chicha de uva más como un refresco que como un alimento en sí. A diferencia de la chicha de maíz o de yuca, esta bebida, por sí sola, no podría ser considerada como sustituta del alimento necesario; sin embargo aporta todos los beneficios de la uva, además de las esencias utilizadas en su elaboración. La bebida lleva consigo la totalidad del aporte nutritivo de la uva debido a que la chicha no pasa por ningún proceso de cocción que altere sus propiedades. Es por esta razón que los fabricantes de esta bebida deben ser muy minuciosos con la higiene de los productos y materiales a utilizar.

Actualmente la elaboración de la chicha se realiza como fuente de ingresos económicos y para mantener esta tradición que caracteriza al cantón. Los fabricantes esperan y aspiran que esta bebida tradicional de la provincia de

Tungurahua sea conocida y consumida en los diferentes sectores o ciudades del país y en un futuro poder comercializarla al exterior.

En la Figura 4 se encuentra el proceso de elaboración de la chicha de uva.

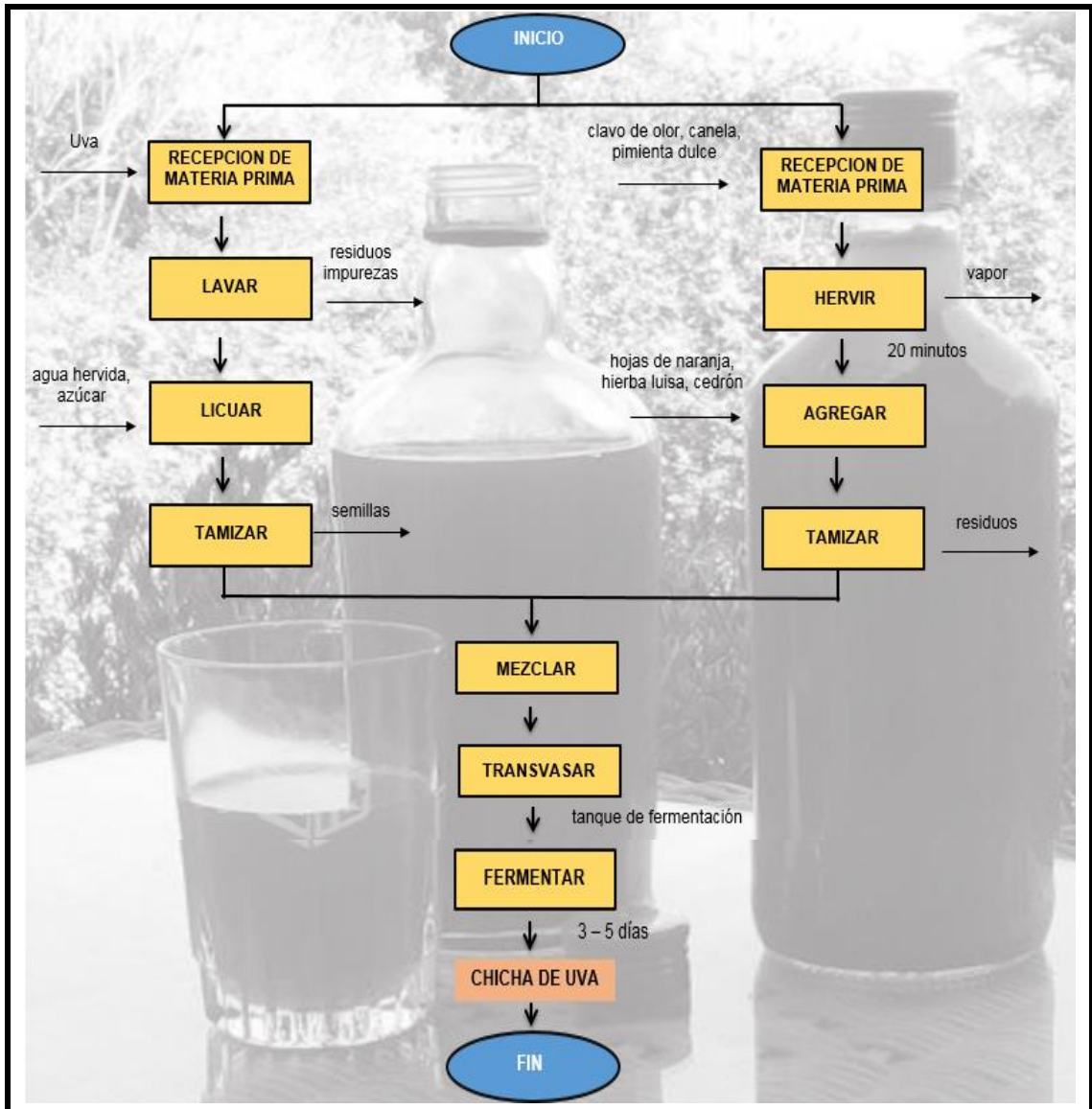


Figura 4. Proceso de elaboración de la chicha de uva

2.5 MICROBIOLOGÍA DE LAS BEBIDAS FERMENTADAS

2.5.1. PRINCIPALES MICROORGANISMOS FERMENTADORES

2.5.1.1 Levaduras

Las levaduras son hongos microscópicos unicelulares que presentan una estructura típica de un organismo eucariota, como se observa en la Figura 5. Son un poco más grandes que las bacterias, siendo su tamaño regular entre 3 y 8 μm de diámetro. Las levaduras se hallan presentes en frutas, flores, suelo y en ambientes que les brinden las condiciones necesarias para su desarrollo; el crecimiento óptimo de levaduras se da a temperaturas de 25 a 30 $^{\circ}\text{C}$, pH entre 3.5 y 4.5 y un contenido razonable de humedad, pudiendo también desarrollarse en cantidades elevadas de soluto. A estas últimas se las denomina osmófilas, que son las que deterioran los alimentos. Algunas levaduras son capaces de resistir temperaturas inferiores a 0 $^{\circ}\text{C}$ pero ninguna resiste temperaturas mayores a 100 $^{\circ}\text{C}$ (García, 2010; Ingraham & Ingraham, 2010).

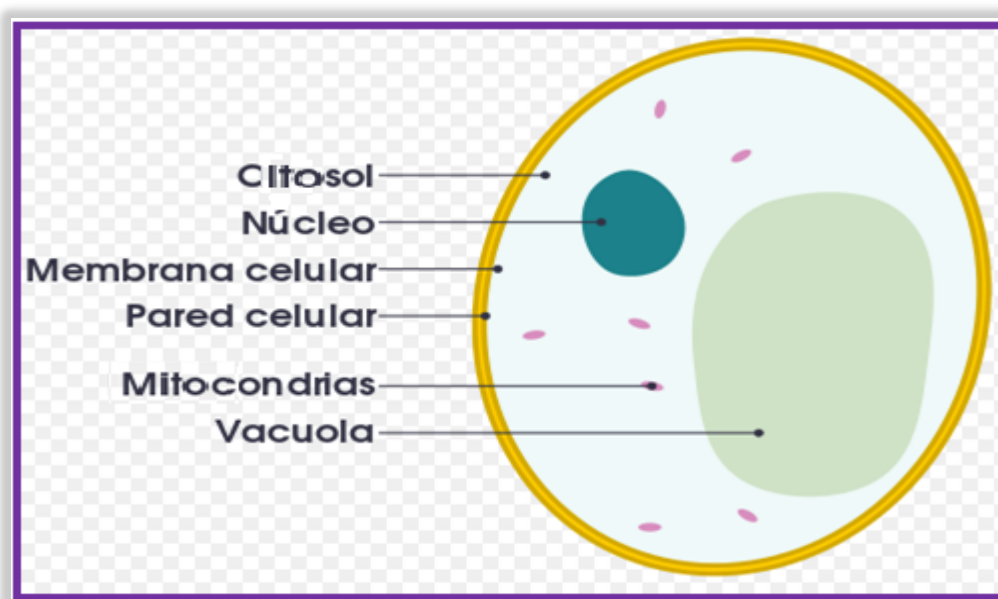


Figura 5. Estructura típica de una levadura
(García, 2010).

Las levaduras no presentan una forma definida, como se puede apreciar en la Figura 6. Vistas al microscopio se las puede observar de forma ovoide, esférica, triangular, cilíndrica, piriforme o en forma de micelios. Sin embargo, las más comunes son ovaladas y de color blancuzco, pudiendo también presentar tonalidades amarillas, cremosas, negras o rosadas (Frazier, 2008).

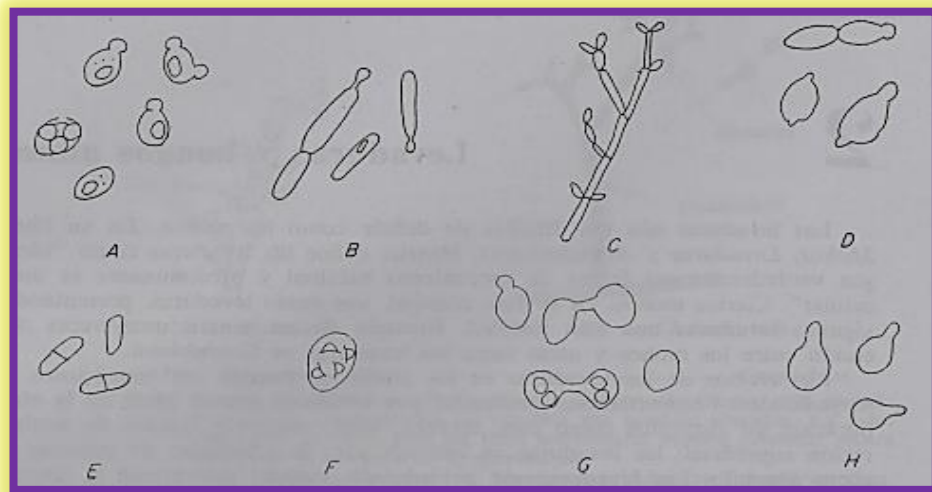


Figura 6. Formas típicas de las levaduras
(Frazier, 2008).

Las levaduras son organismos heterótrofos cuya principal fuente de energía son los azúcares provenientes de la materia orgánica sintetizada por otros organismos. El catabolismo de la glucosa, que consumen las levaduras, se realiza por respiración o fermentación (Frazier, 2008; García, 2010).

La mayoría de levaduras forman parte del grupo de microorganismos aprovechados por el ser humano. Este tipo de hongos son mundialmente conocidos por su capacidad de fermentar los azúcares produciendo CO₂ y etanol (Ordóñez, 2008). A continuación se procede a detallar 4 géneros de levaduras comúnmente utilizados a nivel comercial.

- *Saccharomyces*.- Es el género de levaduras más conocido y aprovechado en la industria alimentaria. La especie *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* es la más eficiente en la transformación de azúcares a etanol y por ende, la más aprovechada en la elaboración de bebidas. *S. lactis* y *S. fragilis* son aprovechadas en el procesamiento de productos lácteos debido a su

poder fermentativo sobre la lactosa. *S. carlsbergensis* es otra especie de levadura utilizada en la elaboración de cerveza (Frazier, 2008).

- *Zygosaccharomyces*.- Algunos investigadores la consideran un subgénero de *Saccharomyces*. Este género de levaduras participa en la fermentación de ciertos vinos y salsas de soya. Su principal característica es la capacidad de desarrollarse en condiciones osmófilas, como por ejemplo *Z. nussbaumeri* (Frazier, 2008).
- *Candida*.- Este género de levaduras forma películas en los alimentos y altera a aquellos muy ácidos o salados. *C. krusei* mantiene la actividad de fermentos lácticos y aumenta su vida útil. *C. famata* se halla distribuida en el medio ambiente pudiendo localizarse en derivados lácteos (Frazier, 2008).
- *Trichosporon*.- Son levaduras ubicuas de rápido crecimiento. Sus colonias se presentan como una serie de nodulaciones lisas, vellosas de color blanquecino o blanquecino-amarillento. *Trichosporon mucoides* es capaz de fermentar la glucosa pero en bajas concentraciones (Frazier, 2008).

2.5.1.2 Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias del ácido láctico (BAL) o bacterias lácticas son diminutas partículas vivientes ya sea esféricas (cocos) o en forma de bastones largos (bacilos); son organismos inmóviles, unicelulares, Gram-positivos y mayoritariamente catalasa-negativos. Es muy común encontrarlas en productos lácteos y en plantas como la vid. Son microorganismos exigentes en su alimentación: requieren aminoácidos, vitaminas, fuentes nitrogenadas y carbohidratos fermentables (Frazier, 2008). Las BAL toman su nombre debido al producto final que se obtiene de la fermentación de carbohidratos, sintetizando moléculas de ATP (Ingraham & Ingraham, 2010).

A diferencia de otras bacterias, las BAL son capaces de desarrollarse en un pH bajo y tolerar una alcalinidad de hasta 8.5. De acuerdo con el género de estas bacterias serán sus requerimientos de temperatura y humedad, sin embargo, se puede indicar que el género *Lactobacillus*, al ser bacterias mesófilas, prefieren temperaturas entre 28 y 42 °C (Frazier, 2008). Por su requerimiento de oxígeno las BAL generalmente son microaerófilas, pudiendo algunas otras ser anaerobias estrictas o anaerobias facultativas. Su tamaño oscila entre 0.4 y 1 µm para el caso de los cocos y entre 2 a 5 µm para los bacilos (Ordóñez, 2008).

Funcionalmente las BAL pueden ser homofermentadoras o heterofermentadoras. Las bacterias homofermentadoras son comúnmente utilizadas en procesos que requieren grandes cantidades de ácido láctico y tienen un requerimiento mínimo o no requieren ácido acético. Por su parte, las bacterias heterofermentadoras son aprovechadas para la obtención de etanol y ácido láctico, siendo de gran importancia para la elaboración de alimentos procesados (Ratledge & Kristiansen, 2009; Frazier, 2008).

En la Figura 7 se detalla los tres géneros de cocos más importantes para la industria alimentaria.

Por su parte, el representante de los bacilos es *Lactobacillus*. Estos microorganismos son bacilos microaerófilos, largos y delgados, Gram-positivos, catalasa-negativos constituidos por más de 25 especies. Generalmente habitan en la corteza de las plantas, en estiércol de ganado y en productos lácteos. Los más utilizados en la industria de alimentos son: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, *L. fermenti*, *L. caucasicus* y *L. brevis* (Parra, 2010).

Los Lactobacilos son microorganismos de interés en alimentos por presentar las siguientes características:

- Fermentan los azúcares y producen ácido láctico en proporciones considerables. Esto es aprovechado para elaborar productos vegetales y productos lácteos. Sin embargo, se debe tener precaución en la elaboración de vinos o cervezas.
- Son utilizados en ensayos de laboratorio con el propósito de determinar el contenido vitamínico de los alimentos.
- *L. trichodes* y *L. hilgardii* en la elaboración de vinos así como *L. fermenti* en el queso Gruyere son determinantes en la calidad final de dichos productos debido a su producción de gas y ácidos volátiles.
- Son microorganismos termófilos capaces de resistir temperaturas de pasteurización y procesos UHT (Frazier, 2008).

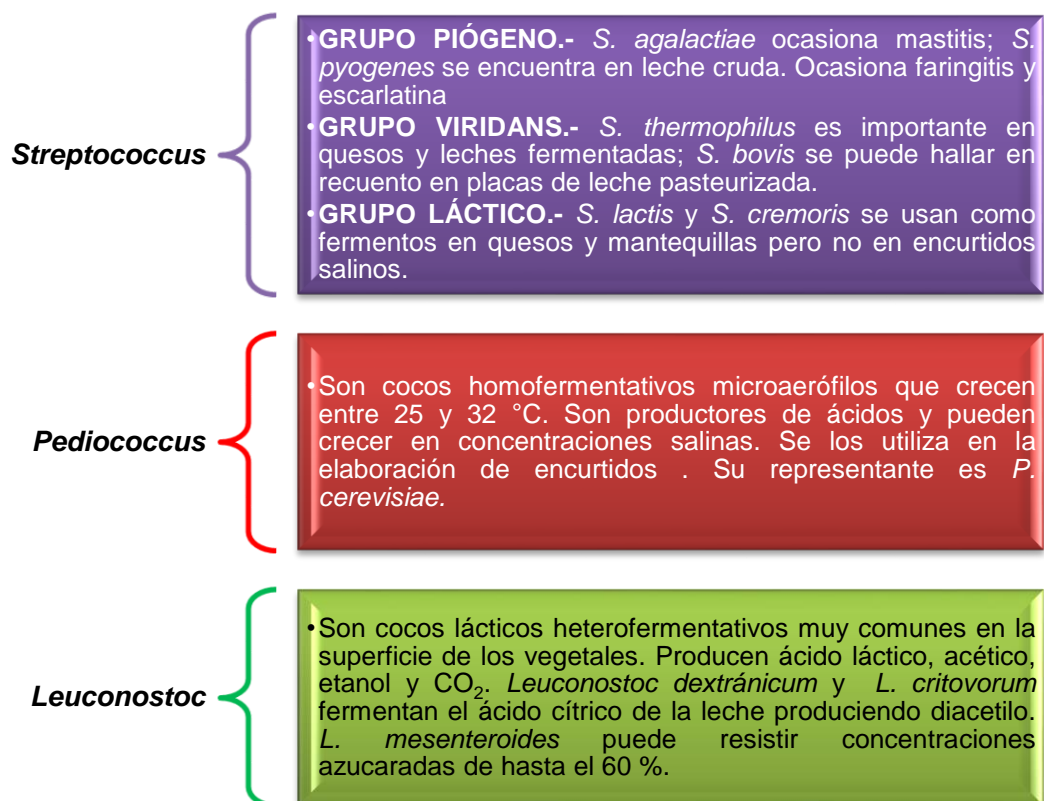


Figura 7. Descripción de los grupos de cocos de interés en alimentos (Frazier, 2008).

2.5.1.3 Mohos

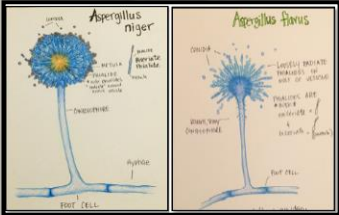
Es el nombre común que reciben ciertos hongos multicelulares, eucarióticos, filamentosos, heterótrofos, carentes de clorofila (lo que los diferencia de las plantas), que presentan falsas raíces llamadas hifas, que al agruparse toman el nombre de micelio, el cual crece superficialmente en los alimentos formando manchas blancas, coloreadas, oscurecidas o como ahumadas, tomando así un aspecto algodonoso o fieltroso (Frazier, 2008; López, 2011).

La reproducción de los mohos muy frecuentemente se realiza de forma asexual a través de esporas que son transportadas por el aire a diferentes sitios en donde se volverán a reproducir si existen condiciones favorables. Es así como se produce la contaminación a los alimentos (Ordóñez, 2008). Pese a esto se considera que, en comparación con el crecimiento de bacterias y levaduras, el de los mohos es lento. (Frazier, 2008).


Los mohos comúnmente pueden ser observados en la superficie de los alimentos. Esto se debe a que son aerobios; siendo las carnes, el queso y los dulces los alimentos más susceptibles a su ataque. Es poco común su presencia en alimentos muy ácidos o alcalinos. Pese a que el crecimiento óptimo de los mohos ocurre a un pH entre 4 y 6, algunos de ellos son capaces de soportar un intervalo de pH de 2 a 9. Además del pH, los mohos han presentado resistencia a la temperatura, a radiaciones ionizantes y a concentraciones altas de azúcar (Tortora, Funke, & Case, 2007). La mayoría de mohos son mesófilos, siendo la temperatura ideal para su desarrollo entre 25 y 30 °C. Pese a esto, algunos se caracterizan por su termorresistencia. Así por ejemplo, Frazier (2008) menciona a *Penicillium*, *Mucor* y *Aspergillus* como los géneros más termorresistentes. Dicho autor considera que los esclerocios de algunos *Penicillium* requieren un tratamiento térmico a 85 °C por 300 minutos para ser destruidos. También hay hongos psicrófilos capaces de resistir temperaturas de hasta -10 °C.

En la Tabla 4 se presenta los principales mohos relacionados con los alimentos.

Tabla 4. Hongos de importancia industrial

MOHOS DE INTERÉS EN ALIMENTOS		
GÉNERO	ESPECIE	CARACTERÍSTICAS
<i>Mucor</i>	<i>M. rouxii</i>	Interviene en la transformación del almidón en glucosa y de esta en alcohol.
Aspergillus 	<i>A. niger</i>	Produce celulosa, gluco-oxidasa, catalasa para la elaboración de alcohol industrial. Influye en la concentración del café líquido. Usado en la industria cervecera.
	<i>A. flavus - oryzae</i>	Producen jarabes por hidrólisis del almidón. Clarificación de jugos, vinos, cervezas. Ablandamiento de la carne por la papaína. Se la aplica en la masa de pan y galletas.
Penicillium 	<i>P. camemberti</i>	Es utilizado en el ablandamiento y maduración del queso Brie y del Camembert para darles una textura suave y cremosa.
	<i>P. roqueforti</i>	Es utilizado para otorgar el aroma típico de los quesos Roquefort y Cabrales. El ácido láctico de este moho permite la desacidificación de las pastas de queso. Sus enzimas proveen un poder proteolítico.
MOHOS PERJUDICIALES PARA ALIMENTOS		
GÉNERO	ESPECIE	CARACTERÍSTICAS
Phytium	<i>Pythium ultimum</i>	Este hongo debe ser muy considerado en huertos y cultivos agrícolas. Ataca las raíces de los cultivos y afecta a las hortalizas.
<i>Rhizopus</i>	<i>R. nigricans</i>	Es conocido como moho negro del pan. Puede atacar a frutas y hortalizas frescas (en especial al tomate) ocasionando podredumbre. Afecta a los cereales y otros granos.
<i>Thamnidium</i>	<i>T. elegans</i>	Es un tipo de hongo similar a Mucor que crece a temperaturas de hasta -2 °C por lo cual es muy común encontrarlos en carnes conservadas en el refrigerador.
<i>Aspergillus</i>	<i>A. repens</i>	Son mohos resistentes a concentraciones salinas y de azúcar altas. Por esta razón los alimentos más afectados son los que tienen un bajo contenido de agua.

Continuación...

MOHOS PERJUDICIALES PARA ALIMENTOS		
<p><i>Penicillium</i></p> 	<p><i>P. expansum</i></p>	<p>Conocido como moho azul, ataca a las manzanas o frutas que presenten hendiduras o corte en su superficie. Además produce una enzima tóxica (patulina) que ocasiona el descarte inmediato de las frutas.</p>
	<p><i>P. digitatum</i></p>	<p>Es el típico moho verde de las frutas. También se desarrolla a partir de heridas en la fruta, a una temperatura de 20 °C y humedad alta.</p>
	<p><i>P. italicum</i></p>	<p>Se lo observa como un moho negro en la corteza. Hace contacto con el alimento a través de las esporas alojadas en el suelo, envases o por el aire. Puede infectar al fruto sin necesidad de que esté presente heridas. La podredumbre de este moho es menos húmeda que la del moho azul.</p>
<p><i>Geotrichum</i></p>	<p><i>G. candidum</i></p>	<p>Algunos lo denominan “hongo de la lechería”. Ataca al pepino, melón, calabaza, frutas en refrigeración (0-5 °C), masa pan, leche y sus derivados. Ocasiona pudrición ácida.</p>
<p><i>Neurospora</i></p>	<p><i>N. sitophila</i></p>	<p>Es un moho encontrado mayoritariamente en el pan y a veces también en los bagazos de las cañas. Tiene una coloración rosada de baja consistencia.</p>
<p><i>Botrytis</i></p>	<p><i>B. cinerea</i></p>	<p>Crece en los alimentos a expensas de otros organismos. Afecta al cultivo de uvas.</p>

(Frazier, 2008)

2.5.1.4 Enterobacterias

Son el grupo más abundante de bacilos Gram negativos. Se denominan entéricos debido a que la mayoría de ellos habitan en el tracto intestinal. El oxígeno que requieren para su desarrollo lo pueden obtener de procesos como la fermentación cuando este se halla ausente; es decir, son organismos anaerobios facultativos (Frazier, 2008).

Como todo microorganismo, su distribución es universal. Se hallan presentes en todo ente vivo o inerte, mayoritariamente en las personas y animales. Su destrucción en alimentos se realiza por esterilización. Estos microorganismos son, comúnmente, poco resistentes a temperaturas mayores a 75 °C y pese a que tampoco se desarrollan a temperaturas inferiores a 5 °C, es preferible eliminarlos por cocción debido a que las toxinas bacterianas entran en letargo al congelar los alimentos pero se activan inmediatamente se descongela el alimento (Ordóñez, 2008).

Las enterobacterias son capaces de fermentar la lactosa luego de 48 horas de haberse mantenido a temperaturas entre 28 a 38 °C en medios de cultivo artificiales (Koneman & Allen, 2012). La importancia de su estudio en alimentos fermentados radica más en la calidad final del producto que por su influencia directa en el proceso de fermentación.

De entre de las enterobacterias, sus principales representantes son las bacterias coliformes. Estas bacterias son bacilos cortos que presentan las características típicas de la familia *Enterobacteriaceae*. Las dos especies típicas de este grupo de bacterias son *Escherichia coli* y *Aerobacter aerogenes*. Estas 2 especies en conjunto son capaces de producir varios ácidos como el láctico, acético o succínico, además de etanol, hidrógeno y dióxido de carbono como resultado de la fermentación de los azúcares (Frazier, 2008).

En la Tabla 5 se procede a numerar las principales bacterias patógenas y los efectos que ocasionan en el organismo.

Tabla 5. Contaminación bacteriana de los alimentos

Bacteria	Características	Fuentes/ Alimentos contaminados	Inhibición del microorganismo
<i>Salmonella</i>	Son bacterias capaces de permanecer largos períodos en la superficie del cuerpo y en alimentos cálidos y húmedos.	Se desarrollan en carnes, huevos y subproductos. Son transmitidos por ratas y animales domésticos.	Alimentos tratados a temperaturas por debajo de 5 °C o mayores a 65 °C.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Son bacterias que se adaptan tanto a temperaturas de refrigeración como a las de pasteurización.	Muy común en la carne cruda de pollo, en mariscos, en hortalizas y en la leche pura.	Con temperaturas menores a 0 °C o mayores a 50 °C. La listeriosis se combate con antibióticos.
<i>Escherichia coli</i>	Es una bacteria de origen intestinal. Produce dióxido de carbono e hidrógeno. Las bacterias infectivas deben tener la toxina Shiga.	Heces fecales, aguas servidas o infectadas, carnes crudas o mal cocinadas.	Lavarse las manos y utensilios con agua potable y jabón antes del contacto con los alimentos.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacterias que segregan toxinas y se transmite por manipulación de productos. Crecen en medios salinos.	Alojadas en la nariz y garganta del humano, en cicatrices o heridas y en secreciones nasales.	Se destruyen al cocinar el alimento contaminado por al menos 30 minutos.
<i>Bacillus cereus</i>	Organismos aerobios que forman esporas aún en condiciones desfavorables.	Los alimentos más infectados son los cereales (arroz, harina).	Tratamiento térmico a 126 °C por 90 minutos.
<i>Clostridium perfringens</i>	Es un organismo aerobio que se reproduce cada diez minutos a temperaturas entre 43-50 °C.	Habita en el suelo, en las heces, en las carnes, en el intestino humano y en animales.	Son eliminados con temperaturas menores a 10 °C o mayores a 63 °C.

(Ordóñez, 2008).

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

3.1 LEVANTAMIENTO DE INFORMACIÓN

Este proceso consistió en obtener información con respecto a la elaboración de la chicha de uva. Esta bebida es típica del cantón Patate y es elaborada por gran parte de sus pobladores. Gracias a la ayuda y total apertura al diálogo de 3 comerciantes informales se obtuvo la información necesaria.

Se consultó a los pobladores respecto a la materia prima básica de esta bebida: los cultivos de vid en Ambato. Con base en las referencias obtenidas de los mismos moradores del sector, se tuvo la oportunidad de dialogar con el Ing. Samuel Soria, representante de una microempresa de Patate denominada “Vinos y Licores de Samuel”, quien proporcionó importante información respecto a los cultivos de uvas del sector, así como las fuentes de la materia prima para elaborar la chicha de uva.

3.2 ELABORACIÓN DEL PRODUCTO

La parte experimental de este trabajo de investigación se realizó en la Planta Piloto de Alimentos de la Universidad Tecnológica Equinoccial. Se limpió y desinfectó el sitio de trabajo. Los utensilios a utilizar fueron desinfectados con agua hervida y alcohol.

Se preparó 2 litros de bebida. Los materiales y equipos utilizados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Materiales y equipos utilizados para la elaboración de chicha de uva

MATERIALES		
Cantidad	Unidad	Producto
2	Litros	Agua hervida
1	Libra	Uvas
0.6	Libras	Panela molida
3	Unidades	Canela
2	Unidades	Clavo de olor
2	Unidades	Pimienta dulce
2	Hojas	Naranja
2	Hojas	Hierba luisa

EQUIPOS E INSUMOS	
Cantidad	Producto
1	Licuadaora
2	Ollas de acero inoxidable
1	Tamiz
2	Pocillos
1	Paleta
1	Cuchara

El proceso de elaboración de la chicha de uva se halla descrito en la Figura 4 (apartado 2.4.1) y en el Anexo I.

3.3 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

3.3.1 TOMA DE MUESTRAS

Finalizado el proceso de elaboración de la bebida en estudio, mediante la ayuda de un embudo de vidrio estéril, se procedió a colocarla en 2 frascos pyrex de vidrio de 1 000 ml cada uno. Dichos frascos fueron adecuadamente esterilizados junto con los kitsatos y otros materiales.

Luego de envasar la bebida en los frascos pyrex, se procedió a trasladarlos al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Tecnológica Equinoccial en condiciones de refrigeración. En estos frascos permaneció hasta llegar al Área de Transferencia del Laboratorio de Microbiología, en donde se trasvasó a dos kitsatos estériles.

Se tomó una muestra de la bebida de cada kitsato para realizar los análisis físico químicos (día 0); luego se colocó los kitsatos en una cámara de fermentación a 25 °C, evitando el ingreso de luz solar y se los mantuvo en esas condiciones durante todo el proceso de fermentación (días 1 al 4).

Los análisis físico químicos y microbiológicos fueron realizados a diario. Las pruebas físico químicas se realizaron desde el día 0 (día de preparación de la bebida) hasta el día 4, mientras que los análisis microbiológicos iniciaron el día 1 y se realizaron hasta el día 4.

3.3.2 DILUCIONES SUCESIVAS

La preparación de las diluciones para el recuento de los microorganismos en estudio (BAL, coliformes, levaduras y mohos) se realizó tomando como referencia la norma NTE INEN 1 529 – 2 (1999).

De cada uno de los kitsatos, rotulados como K_1 y K_2 , se procedió a tomar 2 botellas con 100 ml de muestra cada una, obteniéndose así 4 botellas con 100 ml de muestra rotuladas como $K_{1.1}$, $K_{1.2}$; $K_{2.1}$ y $K_{2.2}$. De cada una de estas botellas se tomó 10 ml de muestra para colocar en una botella con 90 ml de agua peptonada estéril, correspondiente a la dilución 10^{-1} . Con la ayuda de una micropipeta marca Boeco se procedió a tomar 1 ml de dilución de cada una de las 4 botellas para ser colocada en un tubo pyrex con 9 ml de agua peptonada estéril, obteniéndose así la dilución 10^{-2} . De la misma manera se realizaron las subsiguientes diluciones requeridas hasta obtener el número adecuado de microorganismos por ml, siendo la dilución 10^{-9} la más alta realizada en esta investigación. Todo el proceso fue realizado en una cámara de flujo laminar marca Telstar (Anexo II).

3.3.3 SIEMBRA EN PLACAS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS

Tomando como referencia lo establecido por Díaz, Gamazo y López (2009) se procedió a realizar la siembra en placas para el recuento de BAL, coliformes totales, levaduras y mohos.

La siembra de cada grupo microbiano fue realizada por duplicado a partir de diluciones seriadas determinadas. La siembra de mohos y levaduras fue realizada utilizando la técnica por extensión: se tomó 0.1 ml de cada dilución y se depositó en la placa Petri con el medio de cultivo (Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol) solidificado, utilizando perlas de vidrio previamente esterilizadas.

Para la siembra de BAL y coliformes totales se utilizó la técnica por vertido, en agar VRB, para el caso de coliformes y agar MRS para BAL.

Las placas Petri fueron selladas y transferidas a la incubadora a diferentes condiciones de incubación según el tipo de microorganismo. Estas condiciones se hallan detalladas en la Tabla 7.

Tabla 7. Medios de cultivo utilizados y condiciones de incubación

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
Levaduras y Mohos	Agar Sabouraud dextrosa con cloranfenicol	De 3-5 días a 25 °C.
BAL	Agar MRS	A 35 °C por 24 horas. Mantener anaerobiosis.
Coliformes totales	Agar VRB	A 37 °C por 24 horas

(Bandler, 2001).

3.3.4 RECuento MICROBIANO

El recuento microbiano puede ser observado en el Anexo III. Luego de transcurrido el tiempo de incubación de los 3 tipos de microorganismos aquí estudiados, se los retiró de la estufa para contarlos.

El recuento de BAL, coliformes, levaduras y mohos se realizó utilizando un contador de colonias marca Boeco. Se tomó en cuenta las placas que presentaron un número de colonias dentro del rango de aceptación de microorganismos, detallado en la Tabla 8.

Tabla 8. Rango de aceptación de microorganismos

Microorganismo	Rango de aceptación
Levaduras y Mohos	10-150 colonias
BAL	30-300 colonias
Coliformes totales	25-250 colonias

(Bandler, 2001)

El resultado del recuento microbiano en las placas Petri se reportó en unidades formadoras de colonias por ml de muestra (UFC/ml), empleando la Ecuación 2.

$$\text{Recuento} \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{Media del número de colonias de placas duplicadas}}{\text{Factor de dilución} * \text{Volumen inoculado en la placa}} \quad [2]$$

3.3.5 AISLAMIENTO DE BAL Y LEVADURAS

El aislamiento de BAL y levaduras se realizó siguiendo la metodología propuesta por Allen y Koneman (2008). Se aisló a 5 cepas de BAL y 5 cepas de levaduras para su posterior caracterización. La selección de éstas se basó en la morfología colonial y para su aislamiento se utilizó el método de aislamiento por estrías cada 45 grados, como se puede observar en la Figura 8 y en el Anexo IV.

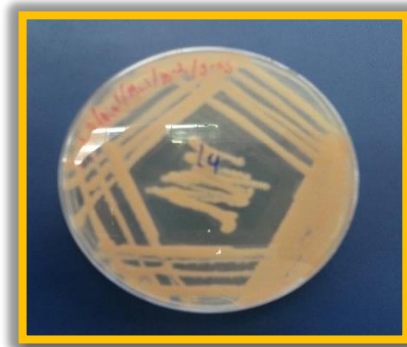


Figura 8. Aislamiento por estrías cada 45°

3.4 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS

3.4.1 CARACTERIZACIÓN DE BAL

Para la caracterización de BAL se utilizó el kit API 50 CHL Medium. Como primer paso se revisó el manual proporcionado por la empresa BIOMÉRIUX con el propósito de obtener conocimientos previos a la utilización del kit.

Se colocó 2 ml de agua destilada esterilizada en un tubo y con la ayuda de una torunda de algodón se tomó una cierta cantidad de colonias de las muestras de cultivos de BAL aisladas. Se sumergió la torunda dentro del tubo y se agitó hasta obtener una suspensión densa, la cual se diluyó con agua destilada y se obtuvo una turbidez igual al estándar 2 de McFarland. La determinación de la turbidez se realizó con la ayuda del espectrofotómetro marca Genesys 20, a una longitud de onda de 625 nm.

Por otro lado, se preparó la galería API 50 CH, requerida para la caracterización de bacterias lácticas. Como primer paso se llenó cada uno de los 50 alveolos de la cámara de incubación con 10 ml de agua destilada. Luego se colocó la suspensión bacteriana de API 50 CHL dentro de cada uno de los tubos de la galería; para esto se utilizó una micropipeta marca Boeco. Seguidamente se llenó las cúpulas de los tubos con aceite de parafina hasta la formación de un menisco convexo; esto se realizó con el propósito de crear anaerobiosis. Finalmente se llevó el kit a la incubadora en donde permaneció a una temperatura de 37 °C por 48 horas.

La lectura de los resultados se realizó a las 24 y 48 horas. Los datos obtenidos fueron digitalizados dentro del software API WEB, determinándose el género y especie del microorganismo.

3.4.2 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS

La caracterización de levaduras se realizó con el kit API 20 C AUX. La metodología utilizada previa al proceso de caracterización de levaduras fue similar a la desarrollada para la caracterización de BAL (apartado 3.4.1). En este caso la incubación se realizó a 29 °C. Los resultados fueron evaluados a las 48 y 72 horas. Para la lectura se tomó como referencia a la muestra control del kit. Las cúpulas observadas con una turbidez mayor a la muestra control se reportaron como positivas (+) en tanto que las que no registraban una turbidez muy alta fueron reportadas como negativas (-). Con el perfil numérico obtenido a partir de los resultados registrados se realizó la caracterización de las 5 cepas de levaduras con las que se trabajó. Se introdujo el perfil numérico en el software API WEB.

En el Anexo V se pueden observar algunas imágenes referentes a la caracterización de BAL y de levaduras realizadas en esta investigación.

3.5 DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICO QUÍMICAS DE LA CHICHA DE UVA

Los análisis físico químicos realizados en la bebida en estudio fueron: pH, acidez, densidad y sólidos solubles. Todos estos fueron realizados en las instalaciones de la Universidad Tecnológica Equinoccial. Las mediciones de la acidez y de sólidos solubles de la bebida fueron realizadas en la Planta Piloto de Alimentos, mientras que las mediciones de pH y densidad se realizaron en los Laboratorios de Química.

3.5.1 DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ

Para la determinación de la acidez se tomó como referencia la NTE INEN 2323 (2002). Esto debido a que en nuestro país no existe normativas o

regulaciones referentes a la chicha. En un vaso de precipitado se colocó 40 ml de la muestra de la bebida y 12 gotas del indicador fenolftaleína.

Se llenó una bureta de vidrio con 100 ml de NaOH 0.1 N y se tituló hasta que la muestra presentó una tonalidad roja intensa. Se procedió a realizar la lectura del volumen gastado en mililitros.

Para obtener el dato de la acidez, expresado como porcentaje de ácido láctico, se utilizó la Ecuación 3.

$$Acidez\ total = \frac{ml\ de\ NaOH\ 0.1\ N * 10}{ml\ de\ muestra * gravedad\ específica\ de\ la\ muestra} * 0.09 \quad [3]$$

En el Anexo VI se puede observar el procedimiento seguido para la determinación de acidez de la chicha de uva.

3.5.2 DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD

Al no existir normativas específicas de la bebida en estudio, la determinación de la densidad se realizó de acuerdo a la NTE INEN 2322 (2002).

Como primer punto se determinó el peso de un picnómetro seco y vacío, marca LMS. A continuación se procedió a llenar el picnómetro con agua destilada para luego dejarlo en la estufa a 20 °C por 30 minutos; transcurrido este tiempo se retiró el picnómetro de la estufa y se determinó su peso. Posteriormente se retiró el agua del picnómetro y se procedió a homogenizarlo con la chicha. Se colocó 10 ml de muestra de la bebida en el picnómetro y se dejó nuevamente en la estufa a 20 °C por 30 minutos. Finalmente se secó el recipiente con papel absorbente y se colocó la muestra en una balanza analítica marca Mettler Toledo. Obtenidos los pesos correspondientes, se utilizó la Ecuación 4 que se puede observar a continuación.

$$\text{Gravedad específica } \frac{20^{\circ}\text{C}}{20^{\circ}\text{C}} = \frac{m_c - m_o}{m_a - m_o}$$

[4]

En donde:

m_c = Masa del picnómetro con la muestra de chicha a 20 °C

m_o = Masa del picnómetro vacío

m_a = Masa del picnómetro con agua a 20 °C

En el Anexo VII se muestra el procedimiento seguido para la determinación de la densidad de la bebida elaborada en el presente trabajo.

3.5.3 DETERMINACIÓN DEL pH

El pH se midió según el método establecido en la NTE INEN 2325 (2002), considerando que no existe normativas referentes a la chicha. Se procedió a calibrar el potenciómetro analítico marca Thermo modelo Orion 4 Star del Laboratorio de Química Analítica. Para esto se utilizaron las soluciones buffer a pH de 4.7 y 10. Luego de verificar que el potenciómetro se hallaba correctamente calibrado, se procedió a realizar la lectura de pH para cada muestra de la bebida de interés.

Se colocó 100 ml de muestra en un vaso de precipitación, en el que se introdujo el electrodo del potenciómetro, previamente lavado con agua destilada; una vez que los datos del valor de pH observados en la pantalla del potenciómetro permanecieron fijos, se registró el valor de pH obtenido. Este procedimiento se repitió para las siguientes tres muestras de la bebida. Entre la medición de una muestra y otra se limpiaba el electrodo del potenciómetro y se enceraba el equipo. El proceso hasta aquí descrito puede observarse en el Anexo VIII.

3.5.4 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES

Al no existir normativas referentes a la bebida en estudio, la determinación de sólidos solubles se realizó según la NTE INEN 380 (2012), que hace referencia a la determinación de sólidos solubles de conservas vegetales por el método refractométrico.

En el Anexo 9 se reportaron las evidencias correspondientes a la determinación de sólidos solubles.

3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el diseño factorial AxB para analizar el crecimiento de microorganismos (BAL, coliformes, levaduras y mohos) y el diseño completamente al azar (DCA) para el análisis de parámetros físico químicos (pH, acidez, densidad y sólidos solubles) de la bebida en estudio durante el proceso de fermentación.

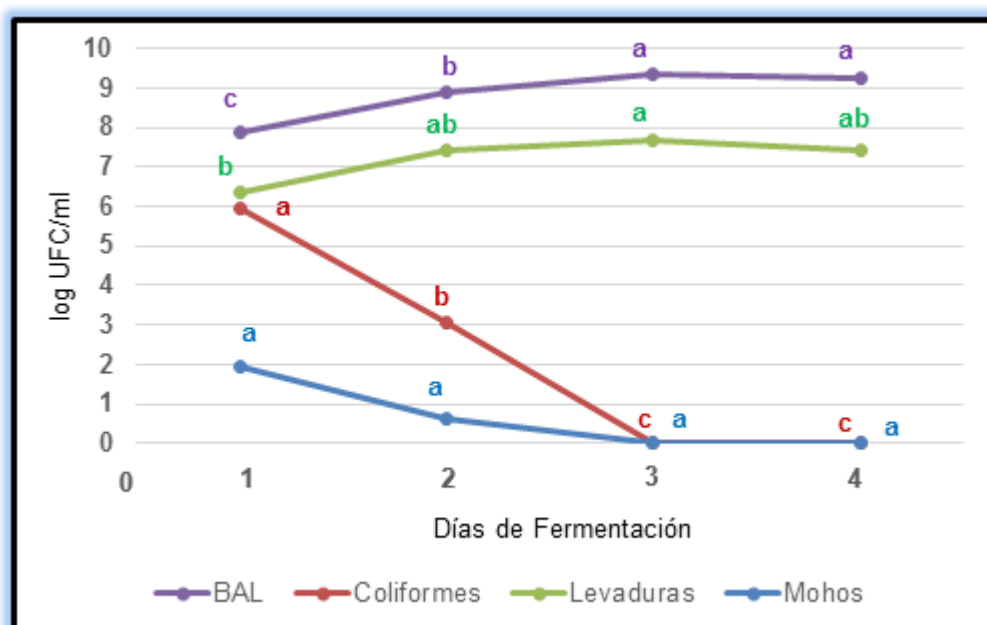
Los resultados fueron procesados mediante un análisis de varianza (ANOVA); las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con una significancia del 0.05 %, usando el software estadístico STATGRAPHICS Centurión XVI.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 RECuentos MICROBIANOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE UVA

En el presente trabajo se realizaron recuentos microbianos de BAL, coliformes, levaduras y mohos. Los resultados obtenidos durante los días 1 al 4 del proceso de fermentación de la chicha de uva pueden ser observados en la Figura 9 y, más detalladamente, en el Anexo X.



Letras diferentes indican que existió diferencia significativa entre valores durante el proceso de fermentación ($p < 0.05$).

Figura 9. Cinética microbiana registrada en el proceso fermentativo de la chicha de uva

4.1.1 RECuentos DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Los recuentos de BAL presentaron valores de 7.8 log UFC/ml a 9.3 log UFC/ml en los 4 días de estudio. En el día 1 el valor registrado fue de 7.8 log UFC/ml, a diferencia del dato reportado por Rivera (2014) sobre las bebidas

fermentadas tradicionales de la provincia de Tungurahua, en donde el recuento promedio obtenido de la chicha de uva fue de 3.3 log UFC/ml. Se considera que el valor registrado en el presente trabajo se debe a que la chicha de uva inició con un pH ácido y al ser las BAL microorganismos ácido tolerantes son capaces de desarrollarse en medio ácido (Ramírez, Rosas, Ulloa, Velásquez & Romero, 2011).

En el segundo día de fermentación el crecimiento microbiano aumentó hasta 8.9 log UFC/ml. Este valor es similar al del estudio realizado por Daw, El-Gizawy y Saiid (1994) en bebidas obtenidas de zumos de frutas, quienes reportaron un crecimiento correspondiente a 8.0 log UFC/ml.

En el tercer día el desarrollo de BAL aumentó en un 5.2 % con respecto al día 2, dato que indica que el crecimiento de este tipo de bacterias continúa en fase exponencial. En el cuarto día de estudio no hubo diferencia significativa en el recuento de BAL respecto al día 3, lo que indica que el cultivo empieza su fase estacionaria habiendo producción de metabolitos secundarios, como ácidos orgánicos; con la transformación de los azúcares en alcohol el crecimiento de bacterias empieza a disminuir (Frazier,2008).

4.1.2 RECuentos DE LEVADURAS

Durante el primer día de fermentación de la bebida en estudio el crecimiento de levaduras reportado fue de 6.3 log UFC/ml. Este valor indica una rápida adaptación de las levaduras al sustrato. De acuerdo a Chavarrea (2011) las levaduras pueden habituarse a un rango de pH entre 3 a 8. El valor de levaduras obtenido en el presente estudio fue superior al encontrado por Rivera (2014), cuyo recuento de levaduras en la chicha de uva fue 3.3 log UFC/ml.

Las levaduras son las responsables de convertir el zumo de uva en vino. Este tipo de hongos aumenta su crecimiento cuando se desarrollan en medios azucarados (Ordóñez, 2008).

El día 3 se presentó el crecimiento más alto de las levaduras. El valor obtenido fue de 7.7 log UFC/ml. Este valor podría estar relacionado con el grado de fermentación alcohólica de la chicha, considerándose a éste, el día de mayor fermentación. Al no existir normativa referente a la bebida de interés en este estudio se tomó como referencia a la NTE INEN 2262 (2003) que indica que el contenido de levaduras debe ser menor a 10 log UFC/ml para el caso de cervezas.

A medida que los azúcares se transforman en etanol la cantidad de levaduras se reduce hasta desaparecer por completo. Esto debido al efecto tóxico que tiene el alcohol sobre las levaduras (Verapinto, 2009).

4.1.3 RECUEENTOS DE COLIFORMES

En el día 1 la cantidad de coliformes fue de 5.9 log UFC/ml. En el trabajo realizado por Rivera (2014) también se reportó contaminación de la chicha por coliformes en una cantidad de 3.0 log UFC/ml. En la investigación realizada por Terán (2014) de bebidas fermentadas de la provincia de Imbabura se obtuvo un valor de 3.5 log UFC/ml de coliformes en la chicha de jora. Todos estos resultados son inferiores al obtenido en este trabajo. Chavarrea (2011) menciona que recuentos altos de estos microorganismos indicadores pueden deberse a falta de higiene en el proceso, tratamientos térmicos insuficientes o fallos en el manejo del alimento durante la cadena de transporte.

En el segundo día de fermentación de la bebida el crecimiento de coliformes se redujo, sin embargo, el valor todavía fue elevado. Se reportó un crecimiento promedio de 3.0 log UFC/ml. En un estudio realizado por Fula (2010) sobre la aptitud para el consumo del masato se obtuvo un crecimiento aproximado de coliformes de 2.9 log UFC/ml concluyéndose con esto que la bebida es apta para el consumo humano debido a que durante la fermentación se inhiben los microorganismos alterantes. Esta consideración

también podría aplicarse a la bebida en estudio, por tratarse de un producto fermentado.

Según Corona, González, Jiménez y Magaña (2010), las bacterias coliformes se ven afectadas por el gradual aumento del contenido alcohólico de la bebida y por la formación de ácidos orgánicos durante el proceso de fermentación. Este criterio explica la razón por la cual no se reportó crecimiento de coliformes en el tercer y cuarto días de fermentación.

4.1.4 RECUENTO DE MOHOS

El crecimiento de mohos fue reportado en los 2 primeros días de fermentación. El día 1 el recuento fue de 1.9 log UFC/ml y el día 2 fue de 0.6 log UFC/ml.

Al no existir una norma específica referente a la bebida en estudio se utilizó como referencia la NTE INEN 2608 (2012), que enmarca los requisitos para bebidas de leche fermentada; esta norma indica que la cantidad de mohos no debe sobrepasar los 2.7 log UFC/ml. Si bien el recuento de mohos obtenido cumple con este requisito, lo ideal sería evitar su desarrollo puesto a que se desconoce si es un microorganismo fermentador, alterante o patógeno.

4.2 ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS

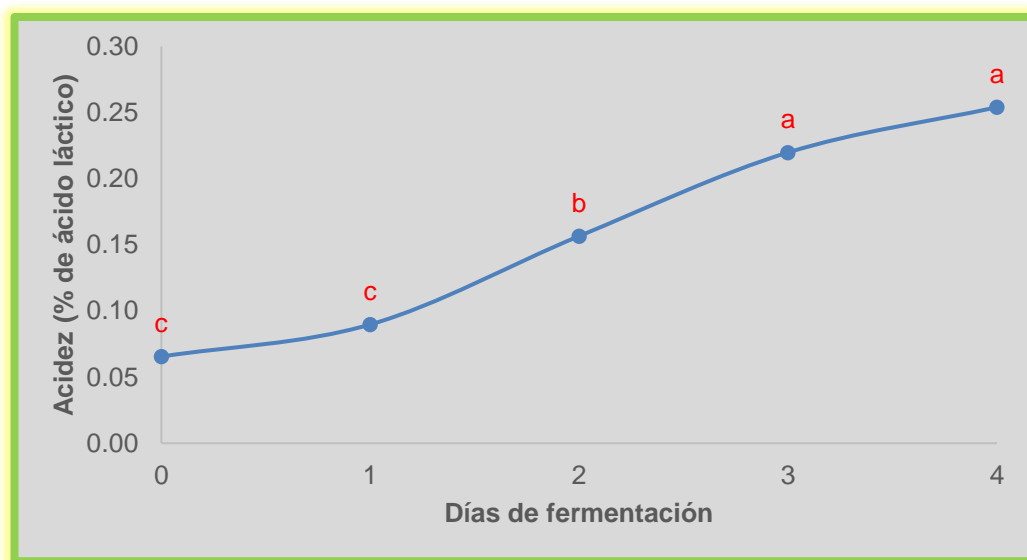
Los resultados obtenidos de los análisis físico químicos pueden observarse en el Anexo XI.

4.2.1 ACIDEZ

En la Figura 10 se pueden observar los datos de acidez de la chicha de uva registrados en el presente estudio. Esta gráfica muestra un aumento de la

acidez de la bebida a medida que avanza la fermentación debido a la formación de ácidos orgánicos durante el proceso (Blasco, 2011).

Londoño y Sepúlveda (2008) estiman que la acidez promedio en bebidas fermentadas suele estar entre 0.3 - 0.6 % de ácido láctico. Si bien no existe una normativa específica para el caso de la chicha, la NTE INEN 2262 (2003) señala que el nivel de acidez total en las cervezas, expresada en ácido láctico, debe ser menor a 0.3. Los valores aquí reportados cumplen con esta norma.

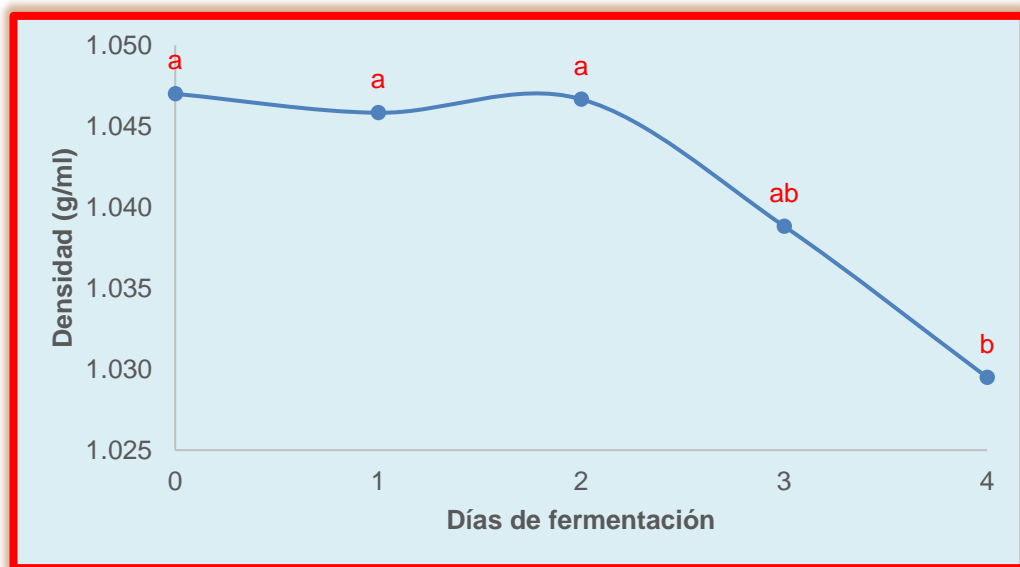


Letras diferentes indican que existió diferencia significativa entre valores durante el proceso de fermentación ($p < 0.05$).

Figura 10. Acidez durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva

4.2.2 DENSIDAD

En la Figura 11 se muestran los valores de densidad reportados en la bebida en estudio. La densidad inicial (día 0) de la bebida fue de 1.047. En el día 1 la densidad bajó hasta cerca de 1.046. El segundo día hubo un ligero aumento (1.047), presentándose a partir del tercer día un descenso en los valores que llegó hasta 1.029, valor correspondiente a la densidad registrada en el día 4.



Letras diferentes indican que existió diferencia significativa entre valores durante el proceso de fermentación ($p < 0.05$).

Figura 11. Densidad durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva

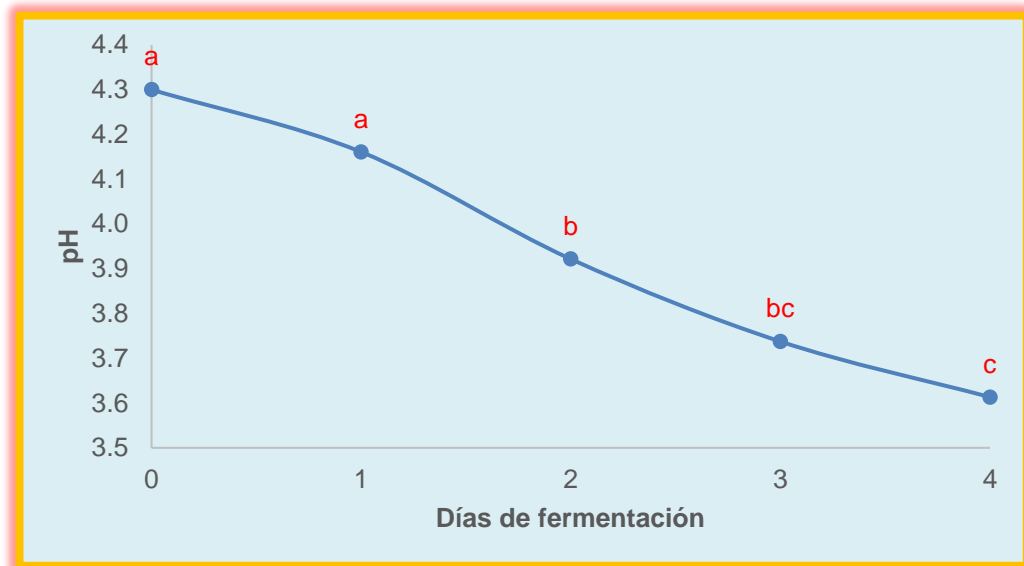
Al empezar el proceso de transformación de azúcares a etanol, la densidad del líquido tiende a decrecer debido a que las moléculas se expanden y pierden fuerza de atracción (Frazier, 2008) lo cual explica los valores obtenidos en el presente estudio.

En un estudio llevado a cabo por Acedo, Álvarez y Zamora (2009) sobre la utilización de levaduras nativas en una bebida denominada Bacanora, los autores reportaron una acidez entre 1.010 y 1.009. Estos valores son similares a los obtenidos en este estudio.

4.2.3 pH

Los resultados obtenidos de la medición del pH durante la obtención de chicha de uva pueden ser observados en la Figura 12. Los valores medidos en las muestras de la bebida fueron disminuyendo al avanzar la fermentación. De acuerdo con Carrera (2014), durante el proceso fermentativo se van produciendo y acumulando ciertas sustancias ácidas,

mismas que ocasionan la reducción del valor de pH de la bebida a medida que pasa el tiempo.



Letras diferentes indican que existió diferencia significativa entre valores durante el proceso de fermentación ($p < 0.05$).

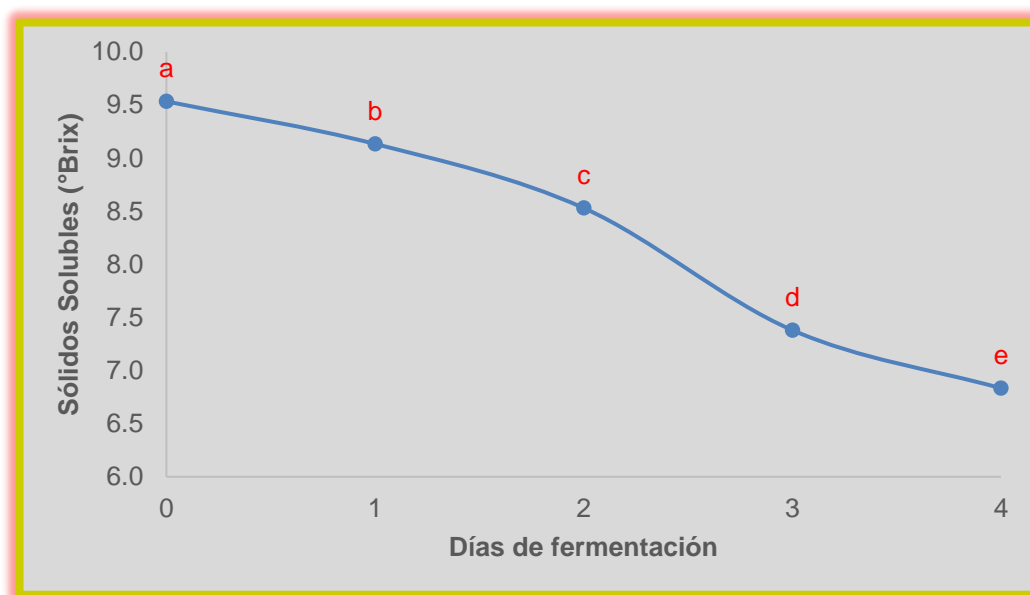
Figura 12. pH durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva

Respecto a la influencia que tiene el pH en el crecimiento microbiano, la mayoría de microorganismos son resistentes a pH ácido. Los mohos pueden desarrollarse en un rango de pH de 2 a 9. Las levaduras prefieren un pH de 4; las BAL se desarrollan mejor cuando el valor de pH oscila entre 3.5 y 4.5, aunque hay especies que pueden desarrollarse a pH menor o mayor y los coliformes son poco resistentes a la acidez del medio (Barreiro, 2006; Frazier, 2008).

En los resultados obtenidos por Carrera (2014), el valor de pH de la chicha de Jora fue de 3.6, el de la chicha de avena fue de 3.5 y 3.2 el del guarapo, en promedio. Estos valores son similares a los obtenidos en la bebida del presente estudio, que estuvieron entre 4.3 (día 1) y 3.6 (día 4).

4.2.4 SÓLIDOS SOLUBLES

Al igual que en los análisis de densidad y pH, la cantidad de sólidos solubles, en °Brix, de la bebida en estudio tuvieron una tendencia a decrecer conforme transcurría el tiempo de fermentación. En la Figura 13 se observa la variación de este parámetro con relación a los días de fermentación.



Letras diferentes indican que existió diferencia significativa entre valores durante el proceso de fermentación ($p < 0.05$).

Figura 13. Sólidos solubles durante el período de fermentación para la obtención de chicha de uva

Rivera (2014) reportó una concentración de sólidos solubles de 9.5 °Brix en promedio para las muestras de chicha de uva y 7.2 °Brix para una bebida tipo licor denominada sánduche. Ambos valores son similares a los obtenidos en la presente investigación.

4.3 CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA CHICHA DE UVA

4.3.1 AISLAMIENTO DEL BAL Y LEVADURAS

En la Tabla 9 se detallan las características fenóticas realizadas en diferentes lotes de producción a 10 cepas de BAL desarrolladas durante el proceso de fermentación de la chicha de uva.

Tabla 9. Características fenóticas de BAL

CEPA	DÍA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS
1	1	Forma ovalada, color blanco, 0.5 cm de diámetro, superficie plana, halo blanco, bacilo Gram positivo.
2	1	Forma redonda, color blanco, 0.4 cm de diámetro, superficie redonda, halo blanco, bacilo Gram positivo.
3	2	Forma redonda, color blanco, 0.1cm de diámetro, superficie plana, no tiene halo, coco Gram negativo.
4	2	Forma ovalada, color crema, 0.4 cm de diámetro, superficie redonda, sin halo, bacilo Gram positivo.
5	2	Forma redonda, color blanco, 0.2 cm de diámetro, superficie plana, halo blanco, bacilo Gram positivo.
6	3	Forma redonda, color blanco, 0.3 cm de diámetro, superficie rugosa, halo blanco, bacilo Gram positivo.
7	3	Forma redonda, color blanco, 0.2 cm de diámetro, superficie plana, halo blanco, bacilo Gram negativo.
8	3	Forma ovalada, color blanco, 0.2 cm de diámetro, superficie plana, no tiene halo, coco Gram positivo.
9	3	Forma redonda, color blanco, 0.1 cm de diámetro, superficie plana, no tiene halo, bacilo Gram positivo.
10	3	Forma ovalada, color blanco, 0.3 cm de diámetro, superficie plana, halo blanco, bacilo Gram negativo.

Por su parte, en la Tabla 10 se muestran las características fenóticas de las levaduras. Se seleccionaron 8 cepas representativas durante los 4 días de fermentación, observándose las características detalladas a continuación.

Tabla 10. Características fenotípicas de levaduras

CEPA	DÍA	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS
1	1	Forma redonda irregular, color blanco, 0.5 cm de diámetro, superficie rugosa, halo blanco.
2	2	Forma redonda, color crema, 0.5 cm de diámetro, superficie redonda, sin halo.
3	2	Forma redonda, color amarillo-rosáceo, 0.5 cm de diámetro, superficie redonda, halo gris.
4	2	Forma redonda, color rosado, 0.5 cm de diámetro, superficie redonda, no tiene halo.
5	3	Forma redonda, color amarillo, 0.4 cm de diámetro, no tiene halo.
6	3	Forma redonda, color blanco, 0.8 cm de diámetro, superficie irregular, no tiene halo.
7	3	Forma redonda, color crema, 0.5 cm de diámetro, superficie redonda, no tiene halo.
8	4	Forma redonda, color amarillo, 0.2 cm de diámetro, superficie redonda, no tiene halo.

4.3.2 CARACTERIZACIÓN DE BAL

Las 5 cepas aisladas fueron: 1 del primer día de fermentación, 2 del segundo día y 2 del tercer día. Las BAL caracterizadas luego de introducir los resultados en el software API WEB se describen en la Tabla 11.

En este estudio se encontraron bacterias lácticas muy comunes en alimentos. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *L. casei* son bacterias utilizadas a escala industrial para la elaboración de alimentos probióticos. La presencia de *Leuconostoc lactis* indica que hubo fallos o parámetros no controlados durante la elaboración de la chicha de uva (Figuroa, 2007).

Tabla 11. Especies de bacterias caracterizadas en la chicha de uva

CEPA	DÍA DE FERMENTACIÓN	ESPECIES CARACTERIZADAS
2	1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
		<i>Leuconostoc lactis</i>
4	2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
		<i>Lactobacillus casei</i>
5	2	<i>Lactobacillus plantarum</i>
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
6	3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>
9	3	<i>Lactobacillus casei</i>
		<i>Lactobacillus pentosus</i>

González, Domínguez-Espinosa y Alcocer (2008) reportaron la presencia de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* en bebidas como el “Dadiah” (bebida fermentada elaborada con leche de búfalo y agua) y en una bebida fermentada en la que se utilizó Aloe vera como sustrato.

Domínguez, Schätzthauer y Zamudio (2010) en un estudio acerca del desarrollo de una bebida fermentada a base de maíz utilizando bacterias probióticas reportaron un aumento en el nivel de acidez de la bebida relacionado con el crecimiento de *Lactobacillus casei*. Además se indicó que el desarrollo de esta especie aumentó cuando el pH estuvo entre 3.3 y 3.7. En el estudio realizado por Pereira, Maciel y Rodríguez (2011) de una bebida fermentada de manzana de anacardo con *Lactobacillus acidophilus* se indicó que el desarrollo de esta bacteria fue muy eficiente (se reportó un crecimiento de hasta 7.5 log UFC/ml) en la bebida y por tanto la consideraron como una alternativa saludable de alimentos funcionales.

En el estudio llevado a cabo en México por Camarillo, Guerra, Reyes y Solís (2009) con respecto al aislamiento de microorganismos nativos en la

fermentación de tejuino, se caracterizó *Lactobacillus delbrueckii*. Trávez (2015) en su estudio sobre la diversidad microbiana asociada a la bebida chaguarmishqui también caracterizó la especie *Lactobacillus delbrueckii* y recalcó la importancia de esta bacteria por ser parte de la microflora nativa de esta bebida. Por su parte Parra (2009) indicó que la bebida fermentada de lactosuero inoculada con *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus salivarius* tuvo un nivel de aceptación bastante bueno por parte de los consumidores.

4.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS

Los resultados de las pruebas realizadas con el kit API 20 C AUX fueron introducidos en el software API WEB™, obteniéndose las especies de levaduras que se presentan en la Tabla 12.

Saccharomyces cerevisiae fue la levadura que participó en la mayoría de etapas del proceso de fermentación de la chicha de uva. Su presencia se reportó desde el segundo día de fermentación.

Bolívar, Delgado y Zúñiga (2009) demostraron en su investigación sobre la obtención de vino de *Hibicus sabdariffa* e identificación de la cepa fermentadora, que *Candida famata* puede ser una eficiente levadura fermentadora, trabajando a pH de 2.6, 24.8 °C de temperatura y 25 °Brix.

Escudero, Grijalva y Pazmiño (2014) reportaron la presencia de *Trichosporon mucoides* en el estudio que realizaron acerca de la diversidad microbiana asociada a la chicha de arroz. De igual manera, Farelo (2012) señala el desarrollo de este tipo de levadura en su investigación sobre la caracterización microbiológica y físico química del "Suero Costeño" durante su proceso de fermentación.

Tabla 12. Especies de levaduras caracterizadas en la chicha de uva

CEPA	DÍA DE FERMENTACIÓN	ESPECIES CARACTERIZADAS
1	1	<i>Candida guilliermondii</i>
		<i>Candida famata</i>
		<i>Trichosporon mucoides</i>
2	2	<i>Candida spherica</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		<i>Candida tropicalis</i>
4	2	<i>Candida famata</i>
		<i>Candida kefir</i>
		<i>Cryptococcus laurentii</i>
		<i>Trichosporon mucoides</i>
5	3	<i>Cryptococcus laurentii</i>
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		<i>Candida guilliermondii</i>
		<i>Candida tropicalis</i>
8	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		<i>Candida utilis</i>

Además de las especies de levaduras detalladas hasta el momento, en la chicha de uva se caracterizó *Candida tropicalis*, *Candida spherica*, *Candida kefir*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida guilliermondii* y *Candida utilis*.

En chaguarmishqui, Trávez (2015) reportó la caracterización de *Candida famata*, *Candida kefir*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii* y *Saccharomyces cerevisiae*. En el trabajo realizado por Páramo (2015) referente a la caracterización físico química y microbiológica de las bebidas fermentadas de la provincia del Carchi se caracterizaron especies como *Cryptococcus laurentii*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichosporon mucoides*.

En el trabajo de Pazmiño (2013), con respecto a la diversidad microbiana asociada a la fermentación de la chicha de arroz en la provincia de Bolívar, algunas de las levaduras encontradas en esta bebida fueron: *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon mucoides*, *Candida guilliermondii* y *Candida utilis*. López, Ramírez y Mambuscai (2009) realizaron una investigación referente a la diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia en la que encontraron *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida guilliermondii*. Argote, Cuervo, López y Mambuscai (2010) caracterizaron especies como *Candida guilliermondii* y *Candida tropicalis* en su estudio titulado “Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva”. En la investigación realizada por Las Heras-Vázquez (2003) se caracterizaron 3 especies de las encontradas en la chicha de uva del presente trabajo: *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* y *Saccharomyces cerevisiae*.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

- El proceso de fermentación de la chicha de uva da lugar al desarrollo de microorganismos benéficos y perjudiciales que reaccionan de forma variada a los factores o condiciones de su entorno.
- Se registró un incremento en el crecimiento de BAL y de levaduras a medida que transcurría la fermentación. En el primer día de fermentación hubo abundante crecimiento de bacterias coliformes, pese a que se trabajó siempre bajo los lineamientos establecidos por normas técnicas, probablemente debido a la alta carga microbiana de la fruta.
- Los resultados de los análisis físico químicos y microbiológicos muestran que la acidez aumentó durante la fermentación, mientras que la densidad, sólidos solubles y pH disminuyeron. Durante la transformación de azúcares de la fruta en etanol las colonias de levaduras y BAL aumentaron, en tanto que el número de coliformes y mohos disminuyó porque fueron inhibidos por la formación de alcohol y ácidos orgánicos como resultado de la fermentación. Al final del proceso el número de BAL y levaduras decreció por la reducción de nutrientes del sustrato. A partir del tercer día de fermentación no se reportó crecimiento de coliformes y mohos.
- La caracterización de microorganismos fermentadores (BAL y levaduras) permitió conocer la diversidad microbiana asociada al proceso fermentativo de chicha de uva. Se encontraron 7 especies de BAL (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus*

rhamnosus, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus pentosus*) y 9 especies de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Trichosporon mucoides*, *Candida spherica*, *Candida tropicalis*, *Candida kefir*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida guilliermondii* y *Candida utilis*). En este estudio no se caracterizaron mohos.

5.2 RECOMENDACIONES

- Se recomienda el mantenimiento de las cepas caracterizadas para la realización de ensayos sobre su capacidad fermentativa, con la finalidad de usar, las que presenten resultados positivos, como cultivos iniciadores en fermentaciones alimenticias.
- Para el caso de estudios referentes a la caracterización de microorganismos se recomienda utilizar bases de datos informáticas como el software API WEB™ utilizado en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acedo, E., Álvarez, M., & Zamora, K. (2009). *Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora*. Revista Latinoamericana de Microbiología, vol. 52, 58-63.
- Acosta, C. (2012). *Evaluación de la fermentación alcohólica para la producción de hidromiel*. Retrieved Mayo 20, 2016, from Universidad Nacional de Colombia: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9933/1/300060.2012.pdf>
- Adlam, K. (2013). *Lactobacillus plantarum and its biological implications*. Retrieved Mayo 20, 2016, from Microbe Wiki: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Lactobacillus_plantarum_and_its_biological_implications
- Aguirre, N. (2013). *Guía Gastronómica del Ecuador*. Dirección Técnica Provincial de Pichincha.
- Allen, S., & Koneman, E. W. (2008). *Diagnóstico Microbiológico* (6ta ed.). Madrid - España.: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Álvarez, J. (2011). *La viña, la vid y el vino*. México: Editorial Trillas.
- Álvarez, Y. (2012). *Historia de la Fermentación*. Retrieved Abril 12, 2016, from http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/historia_de_la_fermentacion.pdf
- Anderson, J., & Gilliland, S. (2013). *Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing Lactobacillus Acidophilus L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans*. Retrieved Mayo 23, 2016, from Journal of the American College of Nutrition: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07315724.1999.10718826>
- Argote, F., Cuervo, R. A., López, W., & Mambuscai, L. (2013). *Identificación de las levaduras nativas presentes en zumos de piña, mora y uva*. Retrieved Mayo 27, 2017, from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11nspe/v11nespa16.pdf>
- Avegaz, K. (2007). *Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria involved in traditional fermentation of borde, an Ethiopian cereal beverage* (Vol. 6). Awassa: African Journal of Biotechnology.
- Bandler, R. (2001). *Bacteriológica Analítica Manual*. Retrieved Mayo 18, 2016, from U.S. Food & Drug Administration: <http://www.911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>
- Barreiro, J. (2006). *Operaciones de Conservación de Alimentos por bajas temperaturas*. Universidad Simón Bolívar - Venezuela: Editorial Equinoccio.

- Beltrán, G., Guillamón, J. M., Gutierrez, A., & Mas, A. (2013). *Metabolismo nitrogenado de Saccharomyces cerevisiae durante la fermentación vínica*. Retrieved Mayo 24, 2016, from Acenología: http://www.acenologia.com/cienciaytecnologia/metabolismo_nitrogenado_saccharomyces_cerevisiae_cienc1013.htm
- Berruecos, L. (2007). *Las bebidas fermentadas y los patrones de consumo de alcohol de los grupos étnicos*. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal.
- Blasco, I. (2011). *A vueltas con la acidez: Los ácidos del vino*. Retrieved Mayo 19, 2016, from Verema: <http://www.verema.com/articulos/498255-acidos-vino>
- Bolívar, N., Delgado, M., & Zúñiga, S. (2009). *Obtención de vino de Hibiscus sabdariffa e identificación de la cepa fermentadora*. Retrieved Mayo 25, 2016, from Universidad Autónoma de Campeche: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_I/II/Carteles/CIII-28.pdf
- Camarillo, A., Guerra, S., Reyes, M. T., & Solis, J. (2009). *Aislamiento e identificación de microorganismos nativos en la fermentación de tejuino artesanal*. Retrieved Mayo 22, 2016, from Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras: <http://www.smbb.com.mx/memcongresos/acapulco09/trabajos/carteles/CARTELES%20AREA%20X/CX-17.pdf>
- Carrera, M. J. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas de la Provincia de Pichincha*. Quito - Ecuador.
- Cartagena, D., & Centellas, K. (2009). *Contaminación Enterobacteriana del Guarapo de una Fábrica de Cochabamba, en Fermentación Normal y Fermentación Flemosa*. Cochabamba - Bolivia: Universidad Mayor de San Simón.
- Chavarrea, M. P. (2011). *Elaboración y conservación con fines agroindustriales y comerciales de la Chicha de Jora y Quinoa en las comunidades beneficiarias del proyecto "Runa Kawsay"*. Riobamba-Ecuador.
- Chiodi, A. (2013). *Chibuku, cerveza africana en caja*. Retrieved Abril 13, 2016, from <https://thebeerdaily.com/2013/02/11/chibuku-cerveza-africana-en-caja/>
- Collado, E. (2009). *Levaduras y la fermentación alcohólica*. Retrieved Abril 11, 2016, from <http://www.verema.com/articulos/500449-levaduras-fermentacion-alcoholica-ii>
- Corona, A., González, N., Jiménez, R., & Magaña, A. (2010). *Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao*

(*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 70-73.

Coronel, M. (2010). *Los vinos de frutas*. Quito - Ecuador.

Cuenca, M., & Quicazán, M. (2005). *Comparación de la Fermentación de Bebida de Soya y Leche de Vaca utilizando un Cultivo Láctico Comercial*. Retrieved Junio 21, 2016, from Universidad Nacional de Colombia: <http://ingenieria.univalle.edu.co/revistaingenieria/index.php/inymce/article/view/69/68>

Daw, Z., El-Gizawy, S., & Saiid, A. (1994). *Microbiological evaluation of some local juices and drinks Cairo*. Cairo-Giza, Egypte: univ., fac. agriculture, microbiology dep.

Delgado, C. (2014). *El libro de bolsillo*. Madrid-España: Alianza Editorial.

Díaz, R., Gamazo, C., & López, I. (2009). *Manual Práctico de Microbiología*. (3ra ed.). Barcelona - España.: Editorial MASSON S.A.

Domínguez, M., Schätzthauer, M., & Zamudio, M. (2010). *Desarrollo de una bebida fermentada a base de maíz utilizando bacterias probióticas*. Retrieved 21 Mayo, from http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/AREA_III/CIII-45.pdf

Ehrlich, S. (2015). *Lactobacillus acidophilus*. Retrieved Mayo 22, 2016, from University of Maryland Medical Center: <http://umm.edu/health/medical/altmed/supplement/lactobacillus-acidophilus>

El Universal. (2010, 11 25). *La verdadera historia de las 10 bebidas más famosas*. Retrieved Abril 13, 2016, from <http://www.zocalo.com.mx/seccion/articulo/la-verdadera-historia-de-las-10-bebidas-mas-famosas>

Escudero, M., Grijalva, N., & Pazmiño, D. (2014). *Diversidad microbiana asociada a la chicha de arroz: una bebida tradicional de Bolívar – Ecuador*. Retrieved Mayo 26, 2016, from Universidad Tecnológica Equinoccial: <http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/index.php/revista/article/view/40>

EXPOFRUT. (2013). *UVA, Información Nutricional*. Retrieved Diciembre 12, 2015, from http://www.expofrut.com.ar/PDF/ficha_uva.pdf

Exportadora Subsole. (2010). *Uva Moscatel Rosada*. Retrieved Septiembre 16, 2015, from allbizz: <http://santiago.all.biz/uva-moscatel-rosada-g4645#.Vo7CVE-gZdg>

Farelo, H. (2012). *Caracterización microbiológica y de los parámetros físico químicos relacionados con el proceso de fermentación del “Suero Costeño” como producto final elaborado en el difícil Ariguaní*. Retrieved Mayo 26, 2016, from Universidad de la Sabana:

<http://intellectum.unisabana.edu.co/bitstream/handle/10818/5109/129983.PDF?sequence=1&isAllowed=y>

- Figueroa, I. (2007). *Efecto de prebióticos en el crecimiento de Lactobacillus casei Shirota y Escherichia coli en un sistema de simulación del tracto intestinal*. Retrieved Mayo 22, 2016, from Universidad Autónoma Metropolitana: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI13697.pdf>
- Frazier, W. (2008). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Freire, C. (2002). *Propuesta estratégica para el cultivo de uva en la cuenca baja del río Guayas*. Retrieved Diciembre 12, 2015, from <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3633/1/6160.pdf>
- Freya, W. (2013). *Resveratrol*. Retrieved Septiembre 16, 2015, from <http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/resveratrol.pdf>
- Fula, A. (2010). *Desarrollo de una bebida fermentada con adición de cocción de maíz*. Tesis: Universidad Nacional de Colombia.
- Galindo, S. (2012). *Análisis de la comercialización de platos típicos del Austro en cinco restaurantes de la Ciudad de Cuenca y propuesta del rescate de recetas tradicionales de antaño*. Retrieved Septiembre 16, 2015, from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1635/1/tur108.pdf>
- García, J. (2008). *Maridraje, Enología y Cata de Vinos*. España: Innovación y Cualificaciones Ediciones.
- García, M., Quintero, R., & López-Munguía, A. (2013). *Biotechnología alimentaria*. Editorial Limusa.
- García, V. (2010). *Introducción a la microbiología*. Costa Rica: EUNED.
- Gisbert, Á. (2014). *Las 32 bebidas tradicionales de los países del Mundial*. Retrieved Abril 13, 2016, from <http://www.verema.com/blog/licores-destilados/1198468-32-bebidas-tradicionales-paises-mundial>
- González, B. A., Domínguez - Espinosa, R., & Alcocer, B. R. (2008). *Aloe vera como sustrato para el crecimiento de Lactobacillus plantarum y Lactobacillus casei*. Retrieved Mayo 20, 2016, from Ciencia y Tecnología Alimentaria: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/11358120809487640>
- Guevara, M. (2013). *Establecimiento de variables críticas, parámetros de control y análisis en los procesos productivos de la industria licorera de Caldas*. Retrieved Abril 11, 2016, from <http://www.bdigital.unal.edu.co/pdf>
- Hernández, A. (2010). *Microbiología Industrial*. EUNED.

- Hernández, S., & Martínez, C. (2012). *Obtención de etanol por vía fermentativa a partir de cáscaras de Ananas comosus (piña) evaluando dos de sus principales variables (pH y grados brix) usando como microorganismo productor Saccharomyces cerevisiae*. Universidad de El Salvador: Trabajo previo a la obtención del título de: Licenciatura en Química y Farmacia.
- Hidalgo , G. (2013). *De sidras por Fráncfort*. Retrieved Abril 13, 2016, from http://elviajero.elpais.com/elviajero/2013/09/30/actualidad/1380550063_793546.html
- Hoyer, O. (2012). *La grappa italiana, de los desperdicios del vino a una bebida muy especial*. Retrieved Abril 04, 2014, from <https://omarjhoyer.wordpress.com/2012/05/06/la-grappa-italiana-de-los-desperdicios-del-vino-a-una-bebida-muy-especial/>
- INEN. (1999). *NTE INEN 1529-2: Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico*.
- INEN. (2002). *NTE INEN 2322: Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación de alcohol*.
- INEN. (2002). *NTE INEN 2323: Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación de la acidez total*.
- INEN. (2002). *NTE INEN 2325: Bebidas alcohólicas. Cerveza. Determinación del pH*.
- INEN. (2003). *NTE INEN 2262: Bebidas Alcohólicas. Cerveza. Requisitos*.
- INEN. (2012). *NTE INEN 2608: Bebidas de leche fermentadas. Requisitos*.
- INEN. (2012). *NTE INEN 380: Conservas vegetales. Determinación de sólidos solubles. Método refractométrico*.
- Ingraham, J., & Ingraham, C. (2010). *Introducción a la Microbiología*. Editorial Reverté.
- Jay, J., Loessner, M., & Golden, D. (2009). *Microbiología Moderna de los Alimentos*. Acribia.
- Koneman, E., & Allen, S. (2012). *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana.
- Koolman, J., & Röhm, K.-H. (2009). *Bioquímica: texto y atlas*. México: Ed. Médica Panamericana.
- Las Heras - Vázquez, F. (2003). *Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and séquense análisis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers*. Yeast Res, 3-9.

- López, A. (2011). *Enciclopedia Interactiva Estudiantil SIGLO XXI*. Madrid-España: Ed. CULTURAL S.A.
- López, W., Ramírez, M., & Mambuscai, L. (2009). *Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia*. Retrieved Mayo 27, 2016, from <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v12n2/v12n2a14>
- Lozano, A. (2014). *Tej, el vino de miel etíope*. Retrieved Abril 13, 2016, from <http://www.imujer.com/gourmet/4101/bebidas-tipicas-de-etiofia-tej>
- Londoño, M., & Sepúlveda, J. (2008). *Fermented fresh cheese milkwey beverage inoculated with Lactobacillus casei*. Retrieved Junio 21, 2016, from Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0304-28472008000100017
- Machuca, P. (2013). El arte de hacer tuba: un legado filipino en el occidente de México. *El Universal*.
- Mejía, B. A. (2013). *Las bebidas tradicionales de la provincia de Tungurahua y su incidencia en el desarrollo turístico-gastronómico de la provincia en el período diciembre, 2010 - abril 2011*. Retrieved Mayo 05, 2016, from repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/4610/ts%20hoteleria%20yturismo_2011_102.pdf?sequence=1
- Moreta, M. (2014). *La elaboración de las arepas y la chicha de uva una tradición de Patate*. El Comercio.
- Mtshali, P. S. (2009). *Genetic screening of wine-related enzymes in lactobacillus species isolated from South African wines*. Retrieved Mayo 20, 2016, from ResearchGate: <https://www.researchgate.net>
- Muñoz, I., & Valenzuela, J. (2013). *Principales variedades de uva de mesa en Chile*. Retrieved Diciembre 14, 2015, from <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/ta/NR19034.pdf>
- Ordóñez, J. (2008). *Tecnología de los Alimentos*. Madrid-España: Editorial Síntesis.
- Organización Internacional de la Viña y el Vino. (2015). *El 55% de la producción de uva en el mundo se destina a elaboración de vino*. Retrieved Diciembre 12, 2015, from Ruta del Vino: <https://www.vinetur.com/2015072720379/el-55-de-la-produccion-de-uva-en-el-mundo-se-destina-a-elaboracion-de-vino.html>
- Páramo, A. (2015). *Caracterización físico-química y microbiológica de bebidas fermentadas de la provincia del Carchi*. Quito - Ecuador.
- Parra, A. (2009). *Lactosuero: Importancia en la industria de Alimentos*. Retrieved from Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín: <http://www.scielo.org.co>

- Parra, A. R. (2010). *Bacterias ácido lácticas*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Pazmiño, D. (2013). *Diversidad microbiana asociada a los procesos de fermentación de la Chicha de Arroz en la provincia Bolívar*.
- Pereira, A. L., Maciel, T., & Rodrigues, S. (2011). *Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with Lactobacillus casei*. Retrieved Mayo 21, 2016, from Food Research International: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910004680>
- Ramirez, G., & Pedroza, J. (2011). *Desarrollo de una fermentación alcohólica a pH regulado y temperatura de 25°C y estudio inicial de fermentaciones en sistema continuo*. Retrieved Abril 11, 2016, from <http://www.academia.edu>
- Ramírez, J. C., Rosas, P., Ulloa, J. A., Velásquez, M., & Romero, F. A. (2011). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*. *Revista Fuente*, 1-13.
- Ratledge, C., & Kristiansen, B. (2009). *Biotecnología básica*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.
- Redacción Economía. (2014). *Ecuador importa \$ 25,3 millones en uvas*. El Telégrafo, 7.
- Revoiras, M. A. (2006). *Química, la ciencia básica*. Madrid - España: Editorial Paraninfo.
- Rivera, H. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las bebidas fermentadas elaboradas en la provincia de Tungurahua - Ecuador*.
- Rodríguez, S. (2016, 02 19). *Pulque*. Retrieved from http://bebidas.about.com/od/otros_alcoholes_y_licores/a/Pulque.htm
- Rodríguez, V. (2010). *Umqombothi cerveza Sudafricana*. Retrieved from <http://pasionturismo.com/umqombothi-cerveza-sudafricana/>
- Romero, V. (2012). *Estudio de prefactibilidad para productos con potencial industrial en la península de Santa Elena: Uva de mesa*. Retrieved Enero 06, 2016, from <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3498/1/6025.pdf>
- Rosas, A. (2012). *Análisis de chicha de jora como elemento de identidad gastronómica y cultural de la ciudad de Cuenca*. Retrieved Abril 17, 2016, from Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1630/1/tur103.pdf>
- Saavedra, L. (2012). *Sake, la bebida con más alto contenido alcohólico del mundo*. Retrieved Abril 29, 2016, from <http://www.guioteca.com/cultura-japonesa/sake-la-bebida-con-mas-alto-contenido-alcoholico-del-mundo/>

- Sadava, D. (2008). *Life. The Science of Biology*. USA: Sinauer Associates.
- Sáez, P. (2014). *Factores que influyen en la Fermentación Alcohólica del Vino*. Retrieved Abril 11, 2016, from <http://urbinavinos.blogspot.com/2014/12/factores-que-influyen-en-la.html>
- Salazar, A. (2015). *Chicha, bebida ceremonial y milenaria*. Retrieved Abril 16, 2016, from <http://www.culturaypatrimonio.gob.ec/chicha-bebida-ceremonial-y-milenaria/>
- Simunovic, Y. (2010). *Manual de Bebidas Alcohólicas y Vinagres*. Retrieved Septiembre 16, 2015, from <http://www.derechoagrario.cl/libros/5.pdf>
- Soria, S. (2015, Julio 25). *La chicha de uva y los cultivos de uva en Ambato*. (S. Velasco, Interviewer)
- Terán, J. (2014). *Caracterización físico-química y microbiológica de las principales bebidas fermentadas de la Provincia de Imbabura*. Quito - Ecuador.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. México: Ed. Médica Panamericana.
- Trávez, S. (2015). *Biodiversidad microbiana asociada a los procesos fermentativos de la bebida Chaguarmishqui*. Quito - Ecuador.
- Varise, F. (2011). *Absenta: la moda del "licor maldito"*. Retrieved Abril 30, 2016, from <http://www.lanacion.com.ar/1388134-absenta-la-moda-del-licor-maldito>
- Veintimilla, B. (2015). *El mapa de las chichas ecuatorianas*. El Comercio, 13.
- Velásquez, S., & Jiménez, D. (2012, 11 23). *Historia del Guarapo*. Retrieved Abril 14, 2016, from <http://canergy.blogspot.com/2012/11/la-cao-de-azcar-llego-cali-trada-por.html>
- Verdugo, A. (2013). *Dinámica de levaduras mediante técnicas microbiológicas y moleculares*. Retrieved Mayo 26, 2016, from Artículos Científicos: <http://cuid.unicach.mx/revistas/index.php/lacandonia/article/view/11/10>
- Vincent, M., Álvarez, S., & Zaragoza, J. (2010). *Química Industrial Orgánica*. España: Editorial Universidad Politécnica de Valencia.
- Woods, S. (2013). *No entiendo mucho de vinos pero sé lo que me gusta*. Madrid - España: Editorial Robinbook.
- Yáñez, G. (2011). *Proyecto de factibilidad para la creación de una microempresa productora y comercializadora de uva en el sector de Tumbaco*. Retrieved Diciembre 16, 2015, from <http://dSPACE.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4854/1/QT-02542.pdf>

ANEXOS

ANEXO I.
PREPARACIÓN DE LA CHICHA DE UVA



Lavado de la fruta



Licudo



Cernido del zumo de uva



Cocción de esencias



Cernido de esencias



Chicha de uva

ANEXO II. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



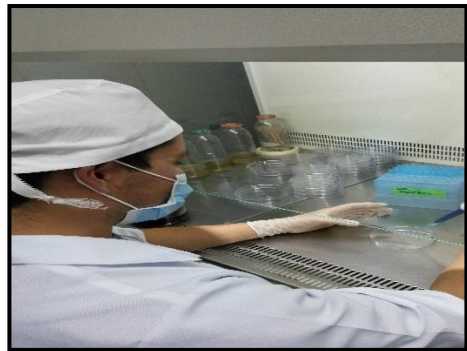
Toma de muestra para análisis de laboratorio



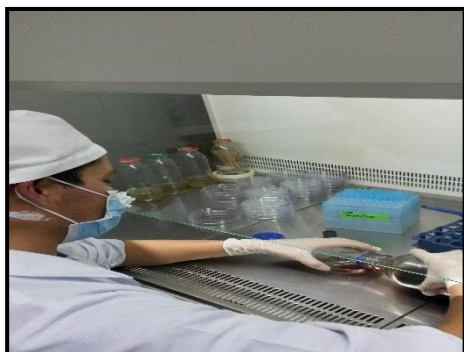
Dilución de la muestra en agua peptonada



Realización de diluciones sucesivas



Siembra de las diluciones en las cajas petri



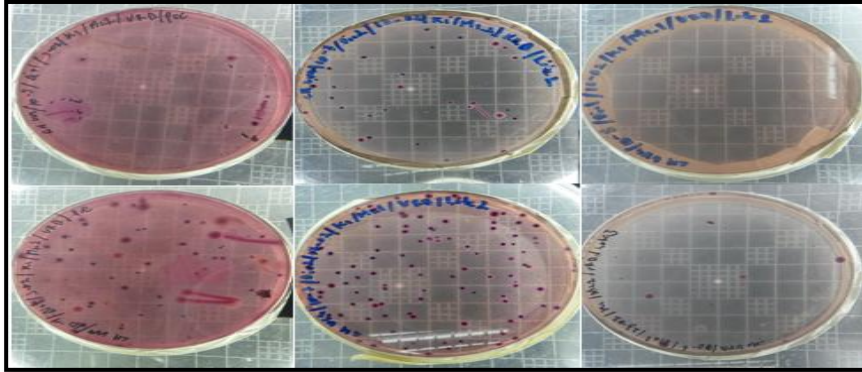
Adición del medio de cultivo



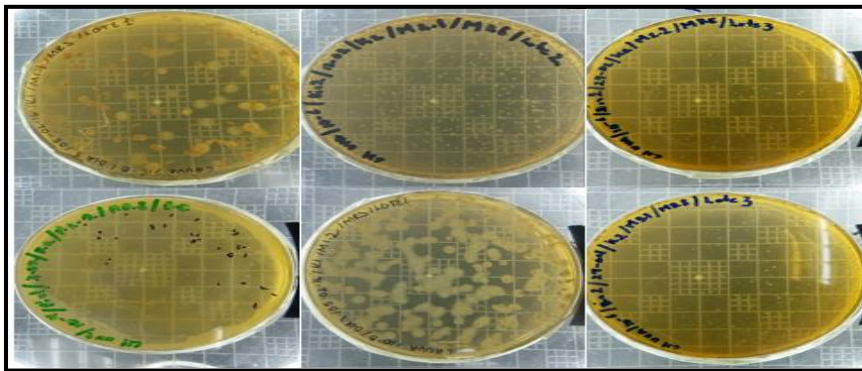
Agitación de las placas

ANEXO III.

RECUENTO DE BAL, LEVADURAS Y COLIFORMES



Recuento de coliformes totales

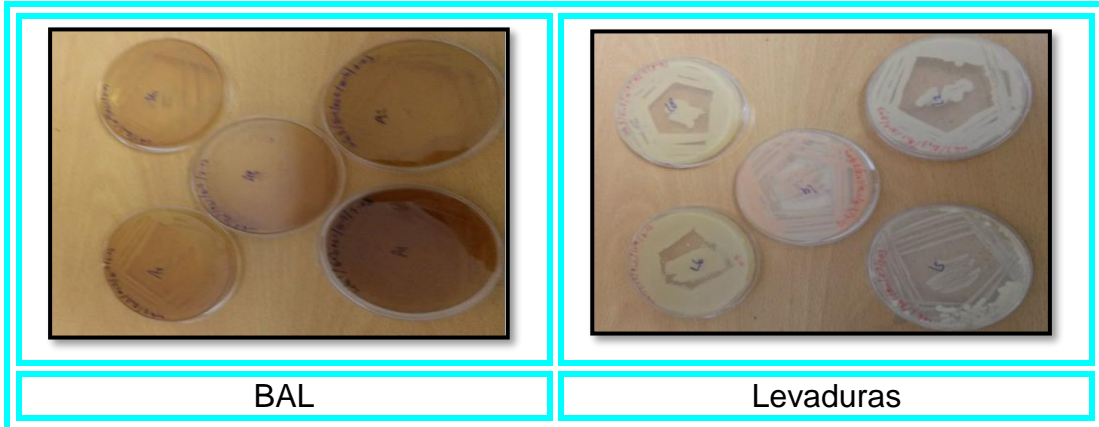


Recuento de BAL



Recuento de levaduras

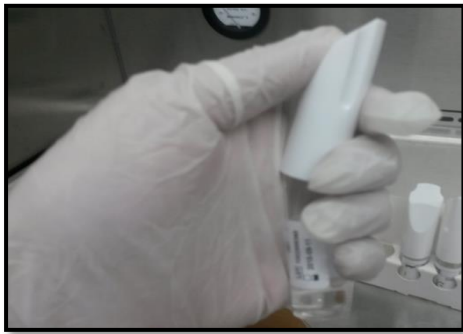
**ANEXO IV.
AISLAMIENTO DE BAL Y LEVADURAS**



**ANEXO V.
CARACTERIZACIÓN DE BAL Y LEVADURAS CON EL
KIT API**



Continuación...



Presión para abrir la ampolla



Ampolla API 50 CHL Medium



Galería API 20 C AUX



Dispersión de la suspensión



KIT API 50 CHL

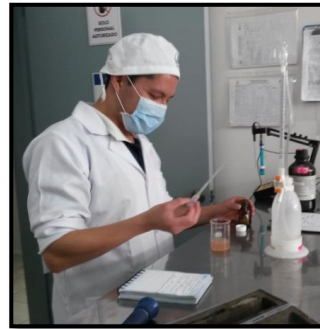


KIT API 20 C AUX

ANEXO VI.
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS.
DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ



Muestra de chicha de uva



Adición del indicador fenolftaleína



Graduación de la bureta automática



Determinación del volumen gastado



Titulación de la muestra

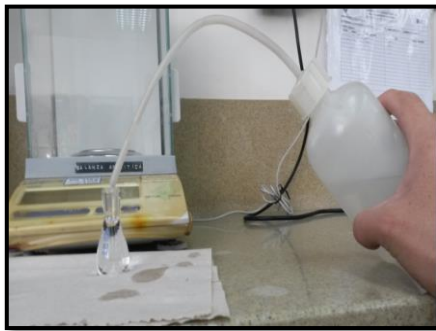
ANEXO VII.
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS.
DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD



Preparación de la balanza analítica



Pesado de picnómetro vacío



Adición de agua destilada en el picnómetro



Pesado del picnómetro con agua destilada



Adición de la muestra de chicha de uva en el picnómetro



Pesado del picnómetro con la muestra de la bebida

ANEXO VIII.
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS.
DETERMINACIÓN DEL pH



Preparación del pH-metro analítico



Calibración del pH-metro



pH-metro analítico calibrado



Introducción del electrodo en la muestra de la bebida



Registro del pH de la muestra



Utilización del pH-metro manual

ANEXO IX.
ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS.
DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES



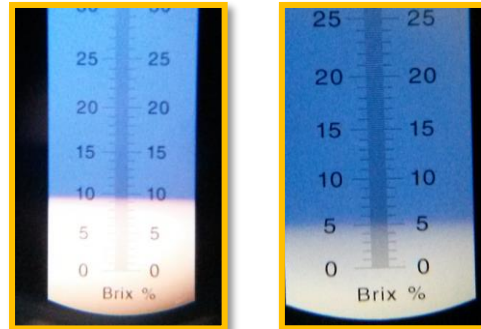
Preparación de la muestra



Preparación del equipo de medición



Determinación de sólidos solubles de la bebida en estudio



Escala de sólidos solubles registrada en las muestras de la bebida



Determinación de sólidos solubles con el refractómetro digital

ANEXO X.

TABLA DE RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LA CHICHA DE UVA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN (log UFC/ml)

DÍA	LOTE	REPETICIÓN	RECIENTOS (log UFC/ml)			
			ÁCIDO-LÁCTICAS	LEVADURAS	COLIFORMES	MOHOS
1	1	1	7.75	6.04	6.36	4.18
1	1	2	7.75	6.00	6.44	3.70
1	2	3	7.74	6.04	5.79	3.69
1	2	4	7.76	5.96	5.80	0.00
1	3	5	8.11	7.06	5.70	0.00
1	3	6	8.08	7.04	5.71	0.00
2	1	1	8.64	6.50	4.7	3.70
2	1	2	8.68	6.47	4.5	0.00
2	2	3	8.71	7.20	4.61	0.00
2	2	4	8.73	7.21	4.52	0.00
2	3	5	9.33	8.53	0.00	0.00
2	3	6	9.36	8.48	0.00	0.00
3	1	1	9.46	6.86	0.00	0.00
3	1	2	9.43	6.84	0.00	0.00
3	2	3	9.13	7.44	0.00	0.00
3	2	4	9.10	7.41	0.00	0.00
3	3	5	9.55	8.82	0.00	0.00
3	3	6	9.52	8.84	0.00	0.00
4	1	1	9.27	6.93	0.00	0.00
4	1	2	9.28	6.94	0.00	0.00
4	2	3	9.02	7.24	0.00	0.00
4	2	4	9.03	7.21	0.00	0.00
4	3	5	9.48	8.03	0.00	0.00
4	3	6	9.48	8.07	0.00	0.00

ANEXO XI.

TABLA DE RESULTADOS OBTENIDOS DE ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS DE LA CHICHA DE UVA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

DÍA	LOTE	REPETICIÓN	GRADOS BRIX	DENSIDAD (g/ml)	ACIDEZ (% de ácido láctico)	pH
0	1	1	9.50	1.048	0.0700	4.20
0	1	2	9.50	1.026	0.0616	4.40
0	2	3	9.50	1.051	0.0651	4.30
0	2	4	9.40	1.055	0.0674	4.30
0	3	5	9.70	1.047	0.0653	4.35
0	3	6	9.60	1.055	0.0637	4.30
1	1	1	9.10	1.046	0.0935	4.15
1	1	2	9.00	1.023	0.1000	4.11
1	2	3	9.00	1.052	0.0748	4.14
1	2	4	9.40	1.054	0.0989	4.16
1	3	5	9.20	1.046	0.0923	4.21
1	3	6	9.10	1.054	0.0792	4.20
2	1	1	8.30	1.040	0.1612	3.66
2	1	2	8.50	1.055	0.1547	3.69
2	2	3	8.50	1.051	0.1552	3.99
2	2	4	8.60	1.042	0.1565	3.91
2	3	5	8.80	1.043	0.1564	4.15
2	3	6	8.50	1.049	0.1555	4.14
3	1	1	7.50	1.045	0.2165	3.54
3	1	2	7.50	1.030	0.2293	3.55
3	2	3	7.30	1.040	0.1882	3.82
3	2	4	7.40	1.042	0.1911	3.82
3	3	5	7.50	1.037	0.2619	3.84
3	3	6	7.10	1.039	0.2317	3.86
4	1	1	6.50	1.036	0.2139	3.48
4	1	2	6.50	1.027	0.2125	3.53
4	2	3	6.50	1.031	0.2887	3.60
4	2	4	7.00	1.033	0.2644	3.57
4	3	5	7.50	1.024	0.2540	3.75
4	3	6	7.00	1.026	0.2901	3.75

ANEXO XII.

TABLA RESUMEN DE LA CARGA MICROBIANA DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE UVA

	Recuento de microorganismos por días (log UFC/ml)			
	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4
Ácido lácticas	7.8 ± 0.18 _c	8.9 ± 0.34 _b	9.3 ± 0.2 _a	9.1 ± 0.2 _a
Coliformes	5.9 ± 0.34 _a	3.0 ± 2.37 _b	<25 _c	<25 _c
Levaduras	6.3 ± 0.54 _b	7.4 ± 0.92 _{ab}	7.7 ± 0.91 _a	7.4 ± 0.52 _{ab}
Mohos	1.9 ± 2.12 _a	0.6 ± 1.51 _a	<10 _a	<10 _a

ANEXO XIII.

TABLA RESUMEN DE LOS ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICOS EVALUADOS DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LA CHICHA DE UVA

	Días de fermentación de la chicha de uva				
	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4
Acidez (% de ácido láctico)	0.06 ± 0.003 _c	0.09 ± 0.010 _c	0.15 ± 0.002 _b	0.22 ± 0.027 _a	0.25 ± 0.034 _a
Densidad (g/ml)	1.047 ± 0.010 _a	1.046 ± 0.011 _a	1.046 ± 0.005 _a	1.038 ± 0.004 _{ab}	1.029 ± 0.004 _b
pH	4.3 ± 0.06 _a	4.1 ± 0.03 _a	3.9 ± 0.21 _b	3.7 ± 0.15 _{bc}	3.6 ± 0.11 _c
Sólidos solubles (°Brix)	9.5 ± 0.10 _a	9.1 ± 0.15 _b	8.5 ± 0.16 _c	7.3 ± 0.16 _d	6.8 ± 0.40 _e