

**Estudio de la fermentación de sacarosa, melaza, mucilago de cacao y miel para la
obtención de etanol.**

Daniel Esteban Ruiz Gómez

Julián David Tarazona Moreno

Trabajo de Grado para Optar al Título de Químico

Director

Hermínul de Jesús Cano Calle

Ph.D. Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria.

A Dios, fuente inagotable de calma en la tormenta, aliento incesante en la fatiga, por su presencia que nunca falla y por la luz que nos guió en cada paso de este camino.

A nuestros queridos padres, Lorena Gómez Solano, Alexey Ruiz, y abuela Josefa Solano, familia de Daniel Ruiz y a Luz Marina Moreno Ortiz, María Amanda Pedraza de Tarazona y a Zaida Mercedes Tarazona Pedraza familia de Julián Tarazona; faros de nuestra vida, quienes nos criaron con un amor que no conoce límites, nos guiaron con una sabiduría impecable y nos enseñaron a soñar, a creer que el esfuerzo es la semilla de todo logro. Gracias por forjarnos y guiarnos a convertirnos en los hombres que hoy están logrando este título. Este triunfo es, y siempre será, suyo.

A la Química, por ser aquello que nos mueve, nos impulsa y nos convierte en la mejor versión de cada uno, una pasión que fuimos experimentando a lo largo de estos años. Por cada noche en vela, por cada experimento fallido y cada pequeña victoria. Por la alegría inmensa de entender un poco más. Pero, sobre todo, por entender que esta es la ciencia del cambio, así como la vida misma.

Agradecimientos

A nuestro director Dr. Herminul de Jesús Cano Calle, cuya invaluable sabiduría, particular sentido del humor, enseñanzas enriquecedoras y su completo compromiso fueron piezas fundamentales en nuestra investigación

A nuestra Alma mater, la Universidad Industrial de Santander (UIS), por acogernos de tal modo que nos hizo sentir la como nuestro segundo hogar durante estos años de formación. Por su infraestructura, por sus recursos y facilidades que pusieron a nuestra disposición, y por ser el espacio donde logramos crecer no solo como profesionales, sino también como personas. Llevaremos siempre su nombre bien grabado en nuestros corazones, con profundo respeto y cariño por esta bella institución.

A mi equipo, la Selección de fútbol UIS, por ser mi fuga en momentos difíciles. Gracias por cada entrenamiento que despejo mi mente y por despertar en mí, el espíritu competitivo. A mis compañeros de equipo.

A ti, Cata, mi fiel acompañante en este largo viaje, por cada consejo, cada momento en que no permitiste que la frustración se hiciera cargo de mí, tu sabiduría, compromiso y amor hicieron que pudiese conseguir este logro, así que también es tuyo.

A mis compañeros de carrera Julián y Mateo por su compañía constante, por las risas compartidas, y por cada palabra de aliento que me recordó que no estaba solo en este proceso, venimos juntos desde el colegio y ese lazo fue capaz de resistir este nuevo camino.

A todos y cada uno de los compañeros y personas que conocí en esta hermosa etapa, especialmente a Daniel y Mateo que siempre me apoyaron, corrigieron y enseñaron

que rendirme no era una opción, a ustedes, gracias por hacerme reír en cada instante y por mostrarme el valor que tiene la amistad.

Tabla de Contenido

Introducción. -----	15
1. Objetivos. -----	18
1.1 Objetivo General-----	18
1.2 Objetivos Específicos.-----	18
2. Marco referencial. -----	19
2.1 Etanol como compuesto químico-----	19
2.2 Fundamentos químicos de la fermentación alcohólica y ruta de Ehrlich -----	20
2.3 Materias primas y su caracterización química -----	25
2.3.1 Técnicas de caracterización. -----	26
2.3.2 (GC-FID) para identificación y cuantificación de alcoholes. -----	26
2.4 Bioquímica y fisiología de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . -----	27
2.5 Cinética y modelado del proceso fermentativo-----	29
2.6 Factores que influyen en la eficiencia fermentativa -----	30
2.7 Procesos de purificación, fundamento de la purificación (Extracción L-L). -----	32
2.8 Control de calidad y normatividad. -----	33
2.9 Optimización del proceso: enfoques metodológicos.-----	35
3. Antecedentes. -----	36
3.1 Contexto Histórico y Evolución Tecnológica -----	36

3.2 Investigaciones sobre optimización de parámetros de fermentación. -----	37
3.3 Estudios sobre materias primas alternativas.-----	38
3.4 Avances en Tecnologías de Separación y Purificación.-----	40
3.5 Investigaciones sobre control de calidad y perfil sensorial. -----	41
3.6 Estudios de Optimización Multivariable Aplicados a Fermentación. -----	42
4. Materiales y metodología.-----	43
4.1 Materiales y reactivos. -----	43
4.2 Metodología.-----	44
4.2.1 Etapa 1: Evaluación base del proceso fermentativo a temperatura ambiente con diferentes fuentes de carbono.-----	44
4.2.2 Etapa 2: Evaluación del proceso fermentativo a temperaturas controladas. -----	54
5. Resultados, análisis y discusión. -----	59
5.1 Cromatogramas (FID) para caracterización de compuestos y cuantificación de etanol. -----	59
5.1.1 Fase 1: temperatura ambiente y sacarosa.-----	59
5.1.2 Resultados fase 2: Temperatura controlada y sacarosa.-----	61
5.1.3 Resultados Fase 3: Temperatura ambiente y miel.-----	63
5.1.4 Resultados Fase 4: Temperatura ambiente y mucílago de cacao. -----	64
5.1.5 Resultados fase 5: Temperatura y melaza. -----	66
5.1.6 Resultados fase 6: Levadura modificada y azúcar. -----	67
5.2 Curva de calibración para cuantificación del porcentaje de etanol. -----	68

5.3 Análisis de cromatogramas de 1.3T y 1.1M obtenidos mediante GC-MS:-----	71
5.4. Análisis estadístico.-----	76
5.4.1 ANOVA de los resultados obtenidos de porcentaje de etanol con sacarosa. -----	76
5.4.2 Modelo Predictivo y Optimización Multivariable. -----	78
5.4.3 Comparación datos agrupados de las diferentes variables del proceso de fermentación. ---	81
5.4.3.2 Comparación %p/v de fuentes de carbono para la obtención de etanol. -----	83
6. Conclusiones -----	89
7. Recomendaciones. -----	92
Referencias bibliográficas.-----	94

Lista de apéndices.

Apéndice 1. Cromatograma y reporte del estándar de metanol. -----	4
Apéndice 2. Cromatograma y reporte del estándar de etanol. -----	5
Apéndice 3. Cromatograma y reporte del patrón de muestra de mezcla (metanol-etanol). -----	5
Apéndice 4. Cromatograma y reporte del lote 1.1(15% azúcar, 1%levadura, T ambiente). -----	6
Apéndice 5. Cromatograma y reporte del lote 1.3(25% azúcar, 1%levadura, T ambiente). -----	7
Apéndice 6. Cromatograma y reporte del lote 2.1(15% azúcar, 1%levadura, T ambiente). -----	8
Apéndice 7. Cromatograma y reporte del lote 2.2(20% azúcar, 1%levadura, T ambiente). -----	9
Apéndice 8. Cromatograma y reporte del lote 2.3 (25% azúcar, 1%levadura, T ambiente). -----	10
Apéndice 9. Cromatograma y reporte del lote 3.1(15% azúcar, 2%levadura, T ambiente). -----	11
Apéndice 10. Cromatograma y reporte del lote 3.2(20% azúcar, 2%levadura, T ambiente). -----	11
Apéndice 11. Cromatograma y reporte del lote 3.3(25% azúcar, 2%levadura, T ambiente). -----	12
Apéndice 12. Cromatograma y reporte del lote 4.1(15% azúcar, 2%levadura, T ambiente). -----	14
Apéndice 13. Cromatograma y reporte del lote 4.2(20% azúcar, 2%levadura, T ambiente). -----	14
Apéndice 14. Cromatograma y reporte del lote 4.3(25% azúcar, 2%levadura, T ambiente). -----	15
Apéndice 15. Cromatograma y reporte del lote 5.1(15% azúcar, 3%levadura, T ambiente). -----	16
Apéndice 16. Cromatograma y reporte del lote 5.3(25% azúcar, 3%levadura, T ambiente). -----	17
Apéndice 17. Cromatograma y reporte del lote 1.1T (15% azúcar, 1%levadura, 30°C). -----	19
Apéndice 18. Cromatograma y reporte del lote 1.2T (20% azúcar, 1%levadura, 30°C). -----	20
Apéndice 19. Cromatograma y reporte del lote 1.3T (25% azúcar, 1%levadura, 30°C). -----	21
Apéndice 20. Cromatograma y reporte del lote 1.4T (15% azúcar, 2%levadura, 30°C). -----	22
Apéndice 21. Cromatograma y reporte del lote 1.6T (25% azúcar, 2%levadura, 30°C). -----	23

Apéndice 22. Cromatograma y reporte del lote miel 1.1 (15% miel, 1%levadura, T ambiente).	-24
Apéndice 23. Cromatograma y reporte lote miel 1.2 (20% miel, 1%levadura, T ambiente).	-----25
Apéndice 24. Cromatograma y reporte del lote mucilago 1.1 (17% mucilago, 1%levadura, T ambiente).	-----25
Apéndice 25. Cromatograma y reporte del lote mucilago 1.2 (10% mucilago, 1%levadura, T ambiente).	-----26
Apéndice 26. Cromatograma y reporte del lote mucilago 1.4 (25% mucilago, 1%levadura, T ambiente).	-----27
Apéndice 27. Cromatograma y reporte de lote levadura modificada 1.2 (25% azúcar, 1 g levadura, T ambiente).	-----28
Apéndice 28. Cromatograma y reporte del lote de levadura modificada 1.3 (15% azúcar, 2 g levadura, T ambiente).	-----29
Apéndice 29. Cromatograma y reporte del lote de levadura modificada 1.4 (20% azúcar, 2 g levadura, T ambiente).	-----30
Apéndice 30. Cromatograma y reporte del lote de levadura modificada 1.5 (25% azúcar, 2 g levadura, T ambiente).	-----31
Apéndice 31. Cromatograma de 1.1 M por GC-MS.	-----33
Apéndice 32. Identificación de señales características de metanol, etanol y sus isotopos de la muestra 1.1M.	-----33
Apéndice 33. Identificación pico característico del isopropanol en la muestra 1.1 M.	-----34

Lista de Tablas

Tabla 1. Concentraciones y masa.....	46
Tabla 2. Lotes experimentales.	47
Tabla 3. Diseño experimental para la etapa de fermentado con control de temperatura.	55
Tabla 4. Curva de calibración y ecuación de la recta.	68
Tabla 5. Tabla final con todos los componentes de los fermentados, % de etanol e isopropanol.	70
Tabla 6. Comparación de fuentes de carbono.	81
Tabla 7. Comparación de %p/v de fuente de carbono.	83
Tabla 8. Indicadores estadísticos.	84
Tabla 9. Comparación de % de levadura.	85
Tabla 10. Indicadores estadísticos.	86
Tabla 11. Comparación de temperatura.	87
Tabla 12. Indicadores estadísticos.	88

Lista de Figuras

Figura 1. Hibridación sp^3 en la molécula de alcohol.	19
Figura 2. Esquema químico de la descomposición de sacarosa en alpha-glucosa y fructosa por condensación, y su posterior ruptura por hidrólisis.	21
Figura 3. Mecanismo de reacción. (imagen tomada de Kang A, Lee TS. Converting Sugars to Biofuels: Ethanol and Beyond.).....	23
Figura 4. Purificación líquido-líquido.....	33
Figura 5. Esquema metodológico.	44
Figura 6. Montaje del sistema anaerobio.	49
Figura 7. Diagrama de baño maría.....	56
Figura 8. Cromatograma y reporte del lote 1.2 (20% azúcar, 1%levadura, T ambiente).	59
Figura 9. Cromatograma y reporte del lote 5.2 (20%azucar, 3% levadura, T ambiente.)	60
Figura 10. Cromatograma y reporte del lote 1.5T (20% azúcar, 2%levadura, 30°C.).....	61
Figura 11. Cromatograma y reporte del lote 2.1T (15% azúcar, 2%levadura, 35°C).....	62
Figura 12. Cromatograma y reporte del lote miel 1.3 (20% miel, 1%levadura, T ambiente).	63
Figura 13. Cromatograma y reporte del lote mucílago 1.3 (20% mucílago, 1%levadura, T ambiente).....	64
Figura 14. Cromatograma y reporte del lote mucílago 2.1 (15% mucílago, 2%levadura, T ambiente).....	65
Figura 15. Cromatograma y reporte del lote melaza (16 brix, 2% levadura, 35°).	66
Figura 16. Cromatograma y reporte de levadura modificada 1.1 (20% azúcar, 1 g levadura, T ambiente).....	67
Figura 17. Grafica de patrones de etanol y obtención de ecuación de la recta.	66

Figura 18. Cromatograma de 1.3 T por GC-MS.....	72
Figura 19. Señales características de etanol y sus fragmentos en la muestra 1.3 T.....	72
Figura 20. Identificación del pico característico del isopropanol en la muestra 1.3 T.	73
Figura 21. Diagrama de superficie 3D, representativo del ANOVA.....	76
Figura 22. Gráfico comparativo de las fuentes de carbono.	82
Figura 23. Gráfico comparativo de los %p/v de fuentes de carbono.	83
Figura 24. Gráfico comparativo del % de levadura.	85
Figura 25. Gráfico comparativo de temperatura.	87

Resumen.

Título: Estudio de la fermentación de sacarosa, melaza, mucilago de cacao y miel para la obtención de etanol.

Autor: Daniel Esteban Ruiz Gómez, Julián David Tarazona Moreno **

Palabras Clave: Etanol, fermentación, sacarosa, variables, inóculo, cromatografía de gases (GC-FID) y acoplado a masas (GC-MS), ANOVA.

Descripción: Este proyecto de investigación tuvo como objetivo principal analizar y estudiar las condiciones del proceso fermentativo utilizando sacarosa como sustrato base, así como evaluar comparativamente el desempeño fermentativo de fuentes alternativas de carbono como mucílago de cacao, melaza y miel de abejas. Las variables operativas independientes estudiadas incluyeron concentración de azúcar, temperatura y porcentaje de dosificación del inóculo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La cuantificación de compuestos volátiles se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), mientras que la identificación cualitativa de compuestos presentes en el fermentado fue llevada a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), permitiendo una caracterización analítica más completa del sistema.

El análisis de varianza (ANOVA) confirmó una interacción estadísticamente significativa entre las variables operativas evaluadas, evidenciando una influencia directa de las condiciones experimentales sobre el porcentaje final de producción de etanol. En la matriz fermentativa elaborada a partir de sacarosa, la concentración más alta fue de 11.96 % v/v de etanol, mientras que condiciones menos favorables redujeron el porcentaje hasta valores cercanos a 3.55 % v/v. Al evaluar fuentes alternativas de carbono, el mucílago de cacao presentó la mayor cantidad de etanol obtenida con un valor de 12.17% v/v, resultado que evidencia el efecto positivo de nutrientes naturalmente presentes en esta matriz sobre la actividad metabólica de la levadura. En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que, aunque el mucílago de cacao presentó altos valores de etanol, la sacarosa por su lado, alcanzó valores con menor dispersión, confirmando la consistencia del diseño metodológico implementado y demostrando que validando la coherencia experimental y el cumplimiento satisfactorio de los objetivos propuestos.

* Proyecto de Grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Herminsul de Jesus Cano Calle. Química, Ph. D.

Abstract.

Title: Study of the fermentation of sucrose, molasses, cocoa mucilage and honey for ethanol production.

Author: Daniel Esteban Ruiz Gómez, Julián David Tarazona Moreno **

Key Words: Ethanol, fermentation, sucrose, operational variables, inoculum, gas chromatography (GC-FID) and mass coupled (GC), ANOVA.

Description: This This research project had as its main objective to analyze and study the conditions of the fermentation process using sucrose as the base substrate, as well as to comparatively evaluate the fermentative performance of alternative carbon sources such as cocoa mucilage, molasses, and honey. The independent operational variables studied included sugar concentration, temperature, and inoculum dosage percentage of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The quantification of volatile compounds was performed using gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID), while the qualitative identification of compounds present in the fermented broth was carried out through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), allowing for a more comprehensive analytical characterization of the system.

Analysis of variance (ANOVA) confirmed a statistically significant interaction among the operational variables evaluated, demonstrating a direct influence of the experimental conditions on the final percentage of ethanol production. In the fermentative matrix prepared from sucrose, the highest concentration reached was 11.96% v/v of ethanol, whereas less favorable conditions reduced the percentage to values close to 3.55% v/v. When evaluating alternative carbon sources, cocoa mucilage presented the highest ethanol content obtained, with a value of 12.17% v/v, a result that evidences the positive effect of naturally occurring nutrients present in this matrix on the metabolic activity of the yeast. Overall, the results obtained demonstrated that although cocoa mucilage presented high ethanol values, sucrose, on its part, reached values with lower dispersion, confirming the consistency of the implemented methodological design and demonstrating the validation of the experimental coherence and the satisfactory fulfillment of the proposed objectives.

* Degree Project.

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Herminul de Jesus Cano Calle. Chemistry, Ph.D.

Introducción.

El etanol, o alcohol etílico (C_2H_5OH), es un compuesto químico de gran relevancia en diversos sectores industriales, destacando su uso como biocombustible, disolvente, antiséptico y en la elaboración de bebidas alcohólicas (Walker & Stewart, 2016). Entre las múltiples vías para su producción, la fermentación alcohólica de azúcares mediante el uso de levaduras, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, se ha consolidado como uno de los métodos más eficientes y sostenibles (Bai, Anderson, & Moo-Young, 2008). Este proceso, que convierte azúcares como la sacarosa en etanol y dióxido de carbono, ha sido ampliamente estudiado y aplicado a nivel industrial, especialmente en regiones con alta disponibilidad de materias primas azucaradas (Soccol et al., 2010). Sin embargo, existen otro tipo de fuentes alternativas ricas en azúcares fermentables que presentan ventajas económicas y de sostenibilidad, como la melaza, las mieles residuales y el mucílago de cacao, cada uno con composiciones y procesos de optimización específicos que se adaptan a estos. (Cardona & Sánchez, 2007; Gutiérrez, 2016).

La sacarosa es un disacárido compuesto por glucosa y fructosa, así mismo, actúa como un sustrato ideal para la producción de etanol debido a su alta fermentabilidad y su abundancia en cultivos como la caña de azúcar (Della-Bianca, Basso, & Gombert, 2013). Sin embargo, el uso de subproductos como la melaza, un residuo denso y viscoso de la refinación del azúcar, se presenta como una fuente económica y ampliamente disponible, con contenido de azúcares fermentables que puede superar el 50%, aunque acompañada de sólidos no fermentables y minerales que pueden inhibir la fermentación (Bvochora et al., 2000; Rabelo, 2016). De manera similar, las mieles residuales de diferentes procesos agroindustriales y el mucílago de cacao un subproducto líquido de la fermentación del cacao rico en glucosa, fructosa y pectinas, representan fuentes alternativas

para la producción de etanol, contribuyendo a la valorización de residuos. (Gómez, 2018; Pino & Peña, 2019).

Cuando se utilizan estas fuentes como materia prima, las levaduras deben hidrolizar los azúcares complejos en sus monosacáridos constituyentes (glucosa y fructosa), los cuales son metabolizados en condiciones anaeróbicas para producir etanol (Bai et al., 2008). Este proceso depende de una serie de factores que influyen en su eficiencia y rendimiento, tales como la concentración y pureza de los azúcares, condiciones de fermentación y las características de la cepa de levadura utilizada, los cuales pueden verse afectados por la composición variable de la melaza y el mucílago, que pueden contener inhibidores naturales o requerir pretratamientos específicos (Alfenore et al., 2004). Por esta razón, mantener un control térmico del medio de cultivo durante la fermentación es crucial. Los calentamientos en baño maría en procesos experimentales de laboratorio a diferentes temperaturas son una práctica estándar; estos permiten lograr una esterilización suave del sustrato, disolver completamente los azúcares y otros componentes; permitiendo de esta forma ajustar con precisión la temperatura óptima de incubación para activar y mantener el metabolismo de la levadura sin desnaturalizar las enzimas. (Bai et al., 2008; Walker, 2017).

La optimización de la producción de etanol a partir de la fermentación de diversas fuentes de azúcares con levadura es un tema de gran interés tanto para la industria como para la investigación científica (Sánchez & Cardona, 2008). Un proceso optimizado no solo maximiza el rendimiento de etanol, sino que también reduce los costos operativos, minimiza la generación de subproductos no deseados y mejora la sostenibilidad del proceso. Por esta razón, cuando se trabaja con materias primas como melaza, mieles o mucílago de cacao hay que tener en cuenta el contenido variable de azúcares para la dilución y la presencia de inhibidores, puesto que estos

hacen más complejos los requerimientos de acondicionamiento. (Cardona & Sánchez, 2007). Teniendo en cuenta la información anterior, la etapa de calentamiento controlado en baño maría resulta ser una herramienta útil que permite estandarizar el punto de partida del proceso, asegurando que los lotes experimentales tengan las mismas condiciones térmicas y de disolución de sustratos, lo que es esencial para una replicabilidad y análisis comparativo. (Liu et al., 2013).

La eficiencia de la fermentación depende en gran medida de la cepa de levadura utilizada; la *Saccharomyces cerevisiae* posee alta tolerancia al etanol, resistencia a inhibidores presentes en melazas (como metales pesados o compuestos fenólicos) y capacidad para metabolizar mezclas complejas de azúcares, esto permite maximizar la producción a partir de fuentes alternativas (Della-Bianca et al., 2013). En el caso del mucílago de cacao, la adaptación de cepas a medios ácidos y con alto contenido de pectinas puede ser un factor determinante (Gómez, 2018). Previo a la inoculación, el medio de cultivo es comúnmente calentado en baño maría para eliminar microorganismos competitivos sin degradar los nutrientes disponibles para la cepa seleccionada (Walker, 2017).

Parámetros como la temperatura y la concentración de azúcares deben ser cuidadosamente controlados para evitar la inhibición del crecimiento de la levadura y garantizar una alta tasa de conversión (Alfenore et al., 2004). Esto es más complejo con materias primas como la melaza, ya que esta puede requerir dilución y ajustes precisos para optimizar la fermentabilidad (Bvochora et al., 2000). El uso de un baño maría para mantener una temperatura constante y uniforme durante la fermentación es una técnica clave en el laboratorio, puesto que evita picos de calentamiento que podrían afectar negativamente la levadura y la cinética enzimática (Liu et al., 2013).

1. Objetivos.

1.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la concentración de sustrato, la concentración de inóculo y la temperatura sobre la producción de etanol durante la fermentación con *Saccharomyces cerevisiae*, así como comparar el comportamiento fermentativo de diferentes fuentes de carbono mediante análisis cromatográficos.

1.2 Objetivos Específicos.

- Determinar el efecto de la concentración inicial de sacarosa (15, 20 y 25% p/v) sobre la producción de etanol (% v/v) en fermentaciones a temperatura ambiente con diferentes dosis de inóculo.
- Comparar el potencial fermentativo de fuentes de carbono alternativas (mucílago de cacao, miel y melaza) frente a la sacarosa, en términos de concentración de etanol alcanzada y perfil cromatográfico de compuestos volátiles.
- Cuantificar e identificar el etanol y otros compuestos volátiles mediante cromatografía de gases acoplada a detector de ionización de llama (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Analizar estadísticamente el efecto de la concentración de sustrato con la sacarosa, la concentración de inóculo y la influencia de la temperatura (ambiente $\approx 26\text{--}27\text{ }^{\circ}\text{C}$, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) sobre la producción de etanol y el perfil de compuestos volátiles generados durante la fermentación.

2. Marco referencial.

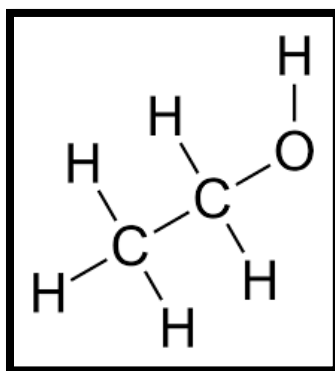
2.1 Etanol como compuesto químico

El etanol o alcohol etílico (C_2H_5OH) constituye uno de los compuestos químicos más importantes en la industria moderna, con aplicaciones que abarcan desde la producción de bebidas alcohólicas hasta su uso como biocombustible y solvente industrial. Según datos de la Agencia Internacional de Energía (2023), la producción mundial de etanol superó los 115 mil millones de litros en 2022, evidenciando su relevancia en la economía global. En Colombia, este compuesto adquiere particular importancia dado el desarrollo de la industria azucarera y la creciente demanda de bebidas espirituosas, que representaron un mercado de 2.8 billones de pesos en 2022, con un crecimiento anual del 4.5% según Euromonitor International (2023).

Desde la perspectiva química, el etanol pertenece a la familia de los alcoholes alifáticos primarios, caracterizado por la presencia de un grupo funcional hidroxilo ($-OH$) unido a un átomo de carbono con hibridación sp^3 .

Figura 1.

Hibridación sp^3 en la molécula de alcohol.



Su estructura molecular, confirmada mediante técnicas espectroscópicas avanzadas, presenta propiedades únicas que lo hacen ideal para múltiples aplicaciones: punto de ebullición de $78.37^{\circ}C$,

densidad de 0.789 g/mL a 20°C, y completa miscibilidad con agua debido a su capacidad para formar puentes de hidrógeno. Estos atributos fisicoquímicos, combinados con su reactividad característica como compuesto anfotero, explican su versatilidad industrial y su papel central en numerosos procesos químicos (Smith, 2020).

En términos de sostenibilidad y eficiencia energética (Zabed et al., 2020). La optimización de este proceso constituye un campo de investigación activo, donde la comprensión profunda de los fundamentos químicos y bioquímicos involucrados resulta esencial para mejorar rendimientos, reducir costos y garantizar la calidad del producto final, especialmente cuando se destina al consumo humano como bebida alcohólica.

2.2 Fundamentos químicos de la fermentación alcohólica y ruta de Ehrlich

La fermentación alcohólica es un proceso bioquímico complejo que sigue principios fundamentales de termodinámica y cinética química. Desde el punto de vista termodinámico, la conversión de glucosa a etanol es un proceso exergónico con un ΔG° de -235 kJ/mol a 25°C y pH 7, lo que indica su espontaneidad bajo condiciones fisiológicas (Alberty, 2003). La reacción global es:



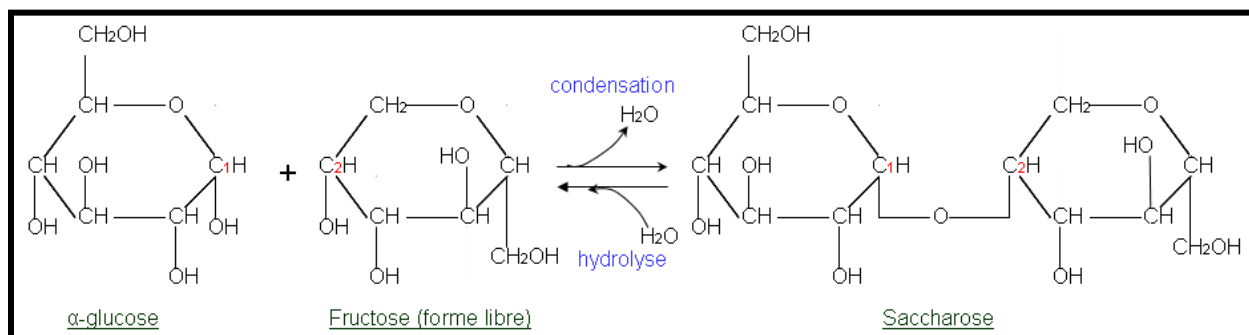
Libera energía que la célula aprovecha para sintetizar ATP, aunque con una eficiencia relativamente baja comparada con la respiración aeróbica. Este balance energético explica por qué los microorganismos fermentativos producen grandes cantidades de sustrato para obtener la energía necesaria para su metabolismo.

Cuando se utiliza sacarosa como materia prima, el proceso inicia con su hidrólisis, una reacción química que rompe el enlace glucosídico mediante la adición de una molécula de agua. La sacarosa (α -D-glucopiranosil-(1→2)- β -D-fructofuranósido) se descompone en sus

monosacáridos constituyentes, glucosa y fructosa, mediante un mecanismo ácido-catalizado que involucra la protonación del oxígeno glucosídico seguida del ataque nucleofílico del agua. Esta reacción, con una constante cinética de $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ a 25°C , puede ser catalizada tanto por ácidos minerales como por la enzima invertasa producida naturalmente por las levaduras (Lehninger, 2017). La sacarosa es un disacárido constituido por una unidad de glucosa y una de fructosa, enlazadas mediante un enlace glucosídico $\alpha(1 \rightarrow 2)$. En esta forma, la molécula no puede ingresar directamente a la glucólisis, por lo que el primer paso del proceso fermentativo corresponde a su hidrólisis. Esta reacción es catalizada por la enzima invertasa, secretada por la levadura. Durante la hidrólisis, una molécula de agua se incorpora al sistema, provocando la ruptura del enlace glucosídico entre ambos monosacáridos. Como resultado, el grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) proveniente del agua se une a uno de los carbonos anoméricos y el protón (H^+) al otro, liberando glucosa y fructosa libres.

Figura 2.

Esquema químico de la descomposición de sacarosa en alpha-glucosa y fructosa por condensación, y su posterior ruptura por hidrólisis.



Una vez hidrolizada la sacarosa, tanto la glucosa como la fructosa ingresan a la vía metabólica de la glucólisis. En el caso de la fructosa, esta es previamente convertida en intermediarios compatibles con la ruta glucolítica, a lo largo de este proceso cada monosacárido

de seis átomos de carbono sufre una serie de reacciones enzimáticas que implican la reorganización progresiva del esqueleto carbonado y la ruptura controlada de enlaces carbono-carbono, dando lugar a la formación de dos moléculas de piruvato, cada una con tres átomos de carbono. Durante este proceso se produce energía en forma de ATP y se reduce el cofactor NAD^+ a NADH.

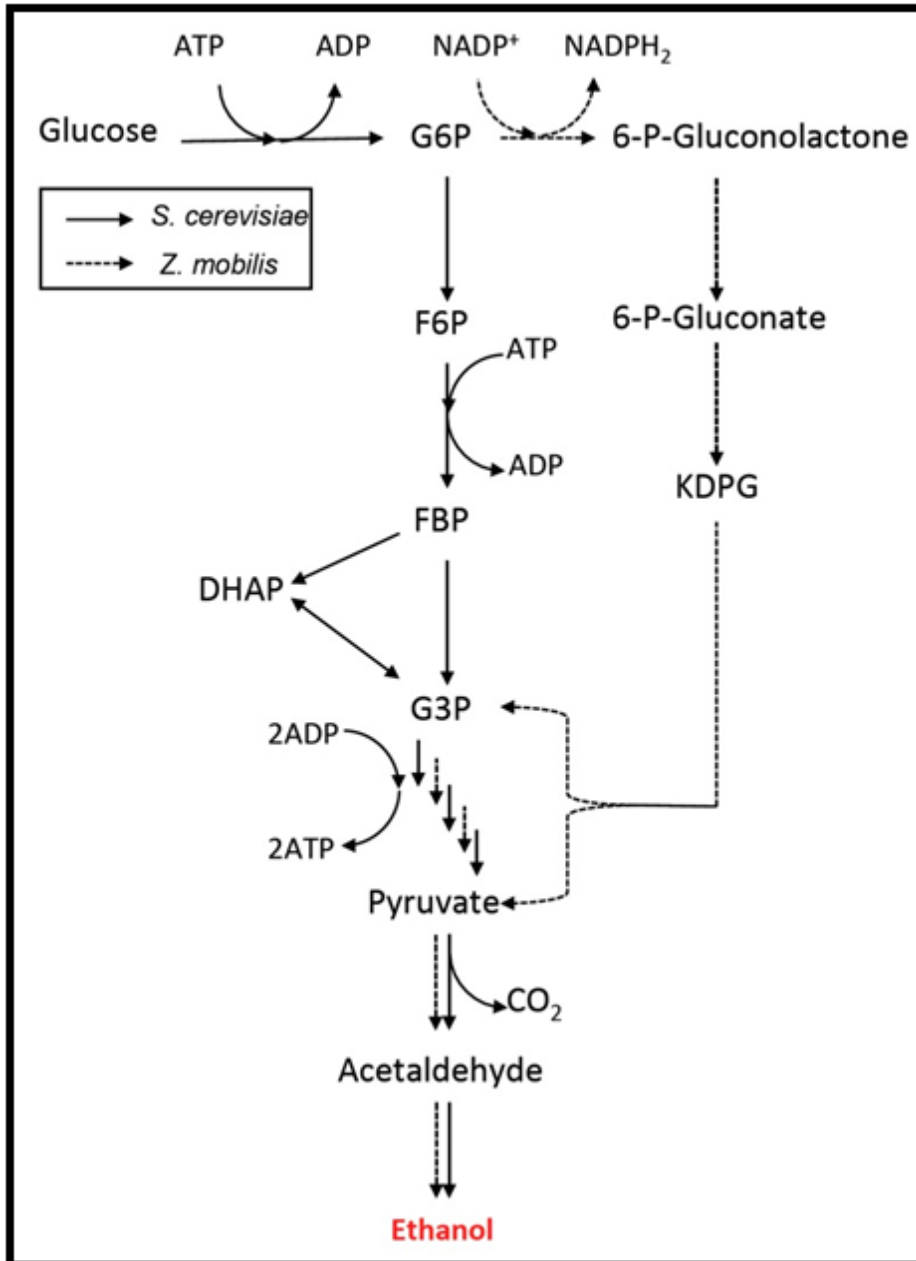
El piruvato generado constituye el intermediario clave de la fermentación alcohólica. En condiciones anaerobias, este compuesto es transformado en acetaldehído mediante una reacción de descarboxilación catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa. En esta etapa se rompe el enlace que mantiene unido el grupo carboxilo ($-\text{COO}^-$) del piruvato, liberándose dióxido de carbono (CO_2). La eliminación de este grupo funcional reduce la molécula de tres a dos átomos de carbono, originando el acetaldehído.

Posteriormente, el acetaldehído es reducido a etanol en una reacción catalizada por la enzima alcohol deshidrogenasa. En este paso, el NADH generado durante la glucólisis cede electrones y protones al grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) del acetaldehído. Esta transferencia electrónica provoca la ruptura del doble enlace carbono-oxígeno y la formación de un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), característico del etanol. De manera simultánea, el NADH se oxida nuevamente a NAD^+ , permitiendo la continuidad de la glucólisis y el equilibrio redox celular.

Desde un punto de vista global, la fermentación completa de una molécula de sacarosa, tras su hidrólisis y posterior metabolismo, produce cuatro moléculas de etanol y cuatro moléculas de dióxido de carbono. Este proceso tiene gran relevancia tanto biológica como industrial, ya que constituye la base de la producción de bebidas alcohólicas y de etanol como biocombustible.

Figura 3.

Mecanismo de reacción. (imagen tomada de Kang A, Lee TS. Converting Sugars to Biofuels: Ethanol and Beyond.)



La ruta de Ehrlich es una vía metabólica clave en *Saccharomyces cerevisiae* que permite la degradación de aminoácidos aromáticos y de cadena ramificada (valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano) para producir los denominados alcoholes superiores, además de compuestos de aroma característicos de las bebidas fermentadas. Fue propuesta originalmente por el bioquímico alemán Felix Ehrlich en 1907, quien observó la relación estructural entre ciertos aminoácidos y los alcoholes secundarios producidos durante la fermentación. La ruta consta de tres reacciones enzimáticas secuenciales:

1. **Transaminación:** El aminoácido es desaminado reversiblemente, transfiriendo su grupo amino al α -cetoglutarato para formar el α -cetoácido correspondiente. Esta reacción está catalizada principalmente por aminotransferasas como Bat1p/Bat2p (para aminoácidos de cadena ramificada) y Aro8p/Aro9p (para aminoácidos aromáticos).
2. **Descarboxilación:** El α -cetoácido sufre una descarboxilación irreversible para generar el aldehído correspondiente, con un carbono menos que el aminoácido original. Esta reacción está catalizada por descarboxilasas dependientes de tiamina pirofosfato, como las codificadas por los genes *ARO10*, *THI3* y el complejo *PDC1/PDC5/PDC6*.
3. **Reducción:** El aldehído es reducido a alcohol fusel mediante la acción de alcohol deshidrogenasas (como Adh1p-Adh5p y Sfa1p), utilizando NADH como cofactor.

En sustratos y productos característicos de la ruta de Ehrlich, los aminoácidos son transformados en alcoholes superiores mediante un proceso de tres pasos enzimáticos. Específicamente, la leucina se convierte en α -cetoisocaproato, el cual es posteriormente reducido a 3-metilbutanol, conocido comúnmente como alcohol isoamílico. De manera similar, la isoleucina genera (3S)-3-metil-2-oxopentanoato, que da lugar al 2-metilbutanol, mientras que la valina, a través del α -cetoisovalerato, produce 2-metilpropanol o alcohol isobutílico. En el caso de los

aminoácidos aromáticos, la fenilalanina se metaboliza a fenilpiruvato y finalmente a 2-feniletanol, compuesto de gran importancia aromática; la tirosina se transforma en p-hidroxifenilpiruvato y posteriormente en 4-hidroxifeniletanol (tirosol); y el triptófano, mediante indol-3-ilpiruvato, da origen al triptofol. Estos alcoholes superiores, aunque producidos en cantidades relativamente pequeñas durante la fermentación, son determinantes en el perfil sensorial de bebidas fermentadas y pueden ser modulados mediante el control de las condiciones del proceso y la selección de cepas de levadura.

2.3 Materias primas y su caracterización química

La selección y caracterización de materias primas constituye un aspecto crítico en la optimización del proceso fermentativo. La sacarosa, como disacárido compuesto por unidades de glucosa y fructosa, representa el sustrato tradicional para la producción de etanol de alta calidad. Con una masa molar de 342.30 g/mol y una solubilidad de 211.5 g/100 ml de agua a 20°C, la sacarosa pura ofrece la ventaja de una composición química definida y reproducible (Voet & Voet, 2016). Sin embargo, consideraciones económicas frecuentemente llevan al uso de subproductos azucareros como la melaza, cuyo costo puede ser hasta un 60% menor que el de la sacarosa refinada (Paturau, 1989).

La melaza, residuo final del proceso de cristalización del azúcar, presenta una composición química compleja y variable que influye significativamente en el curso de la fermentación (Ingledew, 2009). Su contenido de azúcares totales (48-55%) incluye principalmente sacarosa (30-40%), glucosa (5-15%) y fructosa (5-15%), acompañados por una fracción significativa de sales minerales (8-12%) que incluyen potasio como catión principal (3-5%), calcio (0.5-2%) y magnesio (0.1-1%). Estos minerales, aunque pueden actuar como cofactores enzimáticos en concentraciones óptimas, también contribuyen a la presión osmótica del medio, afectando la actividad metabólica

de las levaduras. Adicionalmente, la melaza contiene compuestos nitrogenados (2-5%) que sirven como fuente de aminoácidos para el crecimiento microbiano, y ácidos orgánicos (3-8%) como el ácido acético que puede inhibir la fermentación a pH bajos.

Las mieles intermedias, obtenidas en etapas anteriores del proceso de refinación, presentan características intermedias entre el jugo de caña y la melaza final. Con concentraciones de sólidos solubles entre 65-75°Brix, estas mieles contienen porcentajes más altos de sacarosa (45-60%) y menores contenidos de sales y compuestos inhibidores comparados con la melaza, lo que las hace potencialmente más adecuadas para la producción de etanol de calidad superior (Espinosa & Ovando, 2012). Por otra parte, el mucílago de cacao emerge como una materia prima alternativa en regiones cacaoteras, con un contenido de azúcares totales del 10-15% compuesto principalmente por glucosa (6-8%), fructosa (4-6%) y sacarosa residual (1-2%), además de ácidos orgánicos como el cítrico que imparten un pH natural de 3.5-4.5 (García et al., 2021).

2.3.1 Técnicas de caracterización.

La caracterización completa de estas materias primas mediante técnicas analíticas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para azúcares, espectrometría de masas para compuestos orgánicos menores, y espectroscopía de absorción atómica para metales, resulta esencial para establecer correlaciones entre composición química y rendimiento fermentativo (Skoog et al., 2017). Esta información permite no solo seleccionar la materia prima más adecuada según los objetivos de producción, sino también diseñar estrategias de pretratamiento y acondicionamiento específicas para maximizar la eficiencia del proceso.

2.3.2 (GC-FID) para identificación y cuantificación de alcoholes.

La Cromatografía de Gases es la técnica analítica de referencia para la separación y cuantificación de compuestos volátiles en mezclas complejas, como los caldos de fermentación.

El fundamento de la técnica reside en la distribución diferencial de los analitos entre una fase móvil gaseosa (gas de arrastre, generalmente Helio o Nitrógeno) y una fase estacionaria líquida o sólida contenida dentro de una columna capilar. En este proyecto, la separación de la mezcla etanol-metanol se basa en la volatilidad relativa de los compuestos y su afinidad química por la fase estacionaria (polar o no polar). Debido a que el metanol (CH_3OH) posee una cadena carbonada más corta y un punto de ebullición menor (64.7°C) en comparación con el etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), (78.37°C), este tiende a eluir primero en columnas de fase no polar.

Para la detección, se emplea un detector de ionización de llama (FID), el cual es altamente sensible a compuestos orgánicos. En el FID, la muestra eluida se quema en una llama de hidrógeno/aire, produciendo iones que generan una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de carbono en la muestra. Este método permite no solo confirmar la pureza del etanol obtenido, sino también garantizar que los niveles de metanol se encuentren por debajo de los límites permitidos por las normativas técnicas (como la NTC o resoluciones internacionales), utilizando el tiempo de retención (TR) como parámetro de identificación cualitativa y el área bajo el pico para el análisis cuantitativo mediante curvas de calibración externa.

2.4 Bioquímica y fisiología de *Saccharomyces cerevisiae*.

Saccharomyces cerevisiae, la levadura de panadería y cerveza representa el organismo modelo para la fermentación alcohólica debido a su capacidad excepcional para convertir azúcares en etanol con alta eficiencia y su tolerancia relativamente buena a las condiciones de estrés industrial (Walker, 1998). Desde el punto de vista bioquímico, esta levadura posee un sistema enzimático altamente especializado para el metabolismo de carbohidratos, comenzando con la invertasa extracelular que hidroliza la sacarosa antes de su incorporación a la célula. El transporte de monosacáridos al citoplasma se realiza mediante una familia de transportadores de hexosas

(Hxt1-17) con diferentes afinidades y capacidades, permitiendo la adaptación a una amplia gama de concentraciones de sustrato.

El metabolismo central de *Saccharomyces cerevisiae* está finamente regulado mediante mecanismos de control alostérico y modificación covalente de enzimas clave. La fosfofructoquinasa-1 (PFK-1), considerada la enzima limitante de la glucólisis, es inhibida alostéricamente por ATP y citrato, mientras que es activada por AMP, ADP y fructosa-2,6-bisfosfato (Stryer, 2019). Este sistema de regulación asegura que el flujo glucolítico se ajuste a las necesidades energéticas de la célula y a la disponibilidad de sustrato. Similarmente, la piruvato quinasa es inhibida por ATP y alanina, pero activada por la fructosa-1,6-bisfosfato, creando un mecanismo de retroalimentación positiva que acelera la glucólisis una vez iniciada.

La fisiología de *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación muestra adaptaciones específicas al ambiente anaeróbico o microaerofílico. Aunque la fermentación alcohólica es un proceso esencialmente anaeróbico, trazas de oxígeno (0.05-0.10 mmol/L·h) son necesarias para la síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados requeridos para la integridad de membranas (Rosenfeld & Beauvoit, 2003). Esta necesidad microaerofílica explica por qué en procesos industriales se suele realizar una breve aeración al inicio de la fermentación o se añaden extractos de levadura como fuente de lípidos preformados. La levadura también desarrolla mecanismos de tolerancia al estrés osmótico y al etanol, incluyendo la acumulación de glicerol como osmoprotector y modificaciones en la composición lipídica de membranas para mantener su fluidez frente a concentraciones crecientes de alcohol.

El crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivos por lotes típicamente sigue una cinética que puede describirse mediante el modelo de Monod modificado para incluir la inhibición por producto (Bailey & Ollis, 1986). Parámetros cinéticos característicos incluyen una tasa

máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de 0.35-0.45 h⁻¹, una constante de saturación de sustrato (K_s) de 0.5-2.0 g/L para glucosa, y una constante de inhibición por producto (K_p) de 10-15 g/L para etanol. Estos valores, sin embargo, varían significativamente entre cepas y según las condiciones de cultivo, destacando la importancia de la caracterización específica para fines de optimización.

2.5 Cinética y modelado del proceso fermentativo

La cinética de la fermentación alcohólica puede describirse mediante modelos matemáticos que integran el crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la formación de productos. El modelo de Luedeking-Piret, ampliamente utilizado en ingeniería bioquímica, describe la producción de etanol como función tanto del crecimiento celular como de la actividad metabólica de células no crecientes: $d[P]/dt = \alpha \times d[X]/dt + \beta \times [X]$, donde α representa el componente asociado al crecimiento (típicamente 4-8 g etanol/g biomasa) y β el componente no asociado al crecimiento (generalmente 0.05-0.10 g etanol/g biomasa·h) (Shuler & Kargi, 2002). En fermentaciones por lotes con *Saccharomyces cerevisiae*, el término asociado al crecimiento suele dominar, especialmente durante la fase exponencial.

El consumo de sustrato puede aproximarse mediante el modelo de Monod cuando la concentración de azúcares es limitante, pero requiere modificaciones para incluir efectos de inhibición a altas concentraciones (Bailey & Ollis, 1986). Para sacarosa, la velocidad de consumo puede expresarse como: $v_s = (\mu_{\max}/Y_{x/s}) \times [S]/(K_s + [S] + [S]^2/K_i) \times [X]$, donde K_i representa la constante de inhibición por sustrato, que para glucosa en *Saccharomyces cerevisiae* típicamente se encuentra en el rango de 50-100 g/L. Este término cuadrático en el denominador explica la disminución en la tasa de consumo observada cuando las concentraciones de azúcar superan niveles óptimos.

La producción de biomasa durante la fermentación muestra una relación compleja con el consumo de sustrato y la formación de productos. El rendimiento de biomasa respecto al sustrato ($Y_{x/s}$) varía según las condiciones de cultivo, siendo generalmente menor en fermentaciones estrictamente anaeróbicas (0.05-0.10 g/g) que en condiciones microaerofilicas (0.15-0.20 g/g) debido a diferencias en la producción de ATP por molécula de glucosa metabolizada (Walker, 1998). Esta variación tiene implicaciones importantes para la producción de etanol, ya que el carbono desviado hacia la síntesis de biomasa no estará disponible para la formación de alcohol.

Los modelos cinéticos también deben considerar la formación de subproductos como glicerol, ácido acético y alcoholes superiores, que compiten por sustrato y cofactores con la producción de etanol. La síntesis de glicerol, por ejemplo, sirve como mecanismo para reoxidar NADH cuando el balance redox celular no está equilibrado, siguiendo la estequiometría: Dihidroxiacetona fosfato + NADH + H^+ $\rightarrow$ Glicerol-3-fosfato + NAD^+ (Nelson & Cox, 2021). La cuantificación y modelado de estas vías secundarias es esencial para una optimización integral del proceso, especialmente cuando se busca maximizar el rendimiento en etanol.

2.6 Factores que influyen en la eficiencia fermentativa

La eficiencia del proceso fermentativo está determinada por múltiples factores interrelacionados que afectan tanto la cinética como la termodinámica de las reacciones involucradas. La concentración inicial de sustrato representa uno de los parámetros más críticos, con valores óptimos típicamente entre 15-20% (p/v) de azúcares totales (Bai et al., 2008). Concentraciones inferiores limitan la productividad volumétrica final, mientras que concentraciones superiores pueden causar inhibición osmótica, aumentando la presión osmótica según la ecuación de Van't Hoff ($\pi = iCRT$) y reduciendo la actividad acuosa disponible para

reacciones enzimáticas. Para una solución de sacarosa al 20%, la presión osmótica calculada es aproximadamente 15 atm, cercana al límite de tolerancia para muchas cepas de levadura.

La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, liberando aproximadamente 23.5 kcal por cada mol de glucosa consumido. Este calor metabólico puede elevar la temperatura del medio, afectando la fluidez de la membrana plasmática y la estabilidad de la enzima alcohol deshidrogenasa. Por ello, el control térmico a 30°C es crítico.

Asimismo, el uso de altas concentraciones de sacarosa afecta la actividad del agua. Un descenso en la (a_w) genera un gradiente osmótico que deshidrata la célula, obligando a la levadura a sintetizar solutos compatibles como el glicerol para equilibrar la presión interna, lo cual compete directamente con la producción de etanol.

La temperatura de fermentación influye en todas las reacciones bioquímicas según la relación de Arrhenius ($k = A \times e^{(-E_a/RT)}$). Para *Saccharomyces cerevisiae*, la temperatura óptima se encuentra entre 28-32°C, con energías de activación típicas de 50-60 kJ/mol para reacciones enzimáticas clave (Hensing et al., 1995). Temperaturas por debajo de 25°C reducen significativamente las tasas metabólicas, mientras que temperaturas superiores a 35°C causan estrés térmico, desnaturalización proteica y pérdida de viabilidad celular. Además, la fermentación alcohólica es un proceso exotérmico que libera aproximadamente 92 kJ por mol de glucosa fermentada, requiriendo sistemas de enfriamiento eficientes en reactores a gran escala para mantener temperaturas óptimas (Shuler & Kargi, 2002).

La oxigenación y las condiciones redox del medio también juegan un papel crucial. Aunque la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico, trazas de oxígeno (0.05-0.10 mmol/L·h) son esenciales para la síntesis de esterols y ácidos grasos insaturados necesarios para la integridad de membranas (Rosenfeld & Beauvoit, 2003). El potencial redox del medio, que para fermentaciones

óptimas debe mantenerse entre -150 y -200 mV, afecta la proporción de cofactores reducidos/oxidados (NADH/NAD⁺) y por tanto el flujo metabólico hacia diferentes productos. Un Eh muy negativo favorece la producción de glicerol como mecanismo de reoxidación de NADH, mientras que un Eh menos negativo promueve la ruta del etanol.

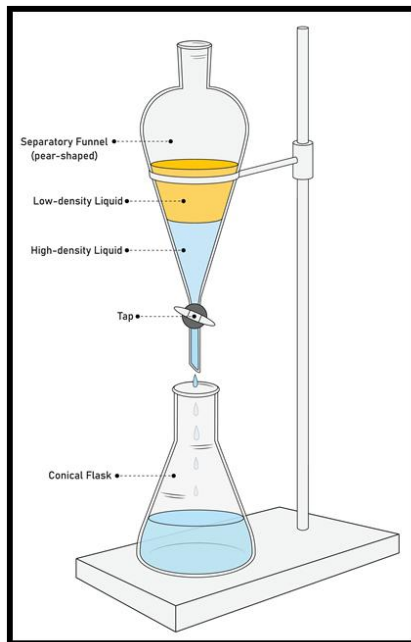
La presencia de nutrientes específicos, particularmente fuentes de nitrógeno asimilable, fósforo, y vitaminas del complejo B, es esencial para un crecimiento y metabolismo óptimos de la levadura (Ingledew, 2009). Deficiencias nutricionales pueden llevar a fermentaciones lentas o incompletas, producción excesiva de subproductos, y mayor susceptibilidad al estrés. En medios basados en melaza, la suplementación con sales de amonio o urea, fosfatos, y extracto de levadura o malta es común práctica para asegurar un perfil nutricional balanceado.

2.7 Procesos de purificación, fundamento de la purificación (Extracción L-L).

El cloroformo (CHCl₃) es un solvente orgánico no polar y denso que no se mezcla con el agua. Al mezclar ambos, se crea un sistema bifásico donde el cloroformo actúa "atrapando" impurezas lipofílicas y proteínas desnaturalizadas, mientras que el etanol y el metanol permanecen en la fase acuosa debido a su alta polaridad y capacidad de formar puentes de hidrógeno.

Figura 4.

Purificación líquido-líquido.



2.8 Control de calidad y normatividad.

El control de calidad en la producción de etanol para bebidas alcohólicas implica el cumplimiento de especificaciones químicas, físicas y sensoriales estrictas definidas por normativas nacionales e internacionales. En Colombia, la Resolución 2058 de 2017 del Ministerio de Salud y Protección Social establece los requisitos sanitarios para bebidas alcohólicas, incluyendo límites máximos para impurezas potencialmente tóxicas como metanol ($<0.5\%$ v/v del alcohol total), furfural (<5 mg/100 ml de alcohol absoluto), y metales pesados (cobre <0.1 mg/kg, plomo <0.2 mg/kg). Estas regulaciones se alinean con estándares internacionales como los definidos por la Organización Internacional del Vino y la Viña (OIV) y la Asociación Americana de Químicos Oficiales de Cereales (AACCI).

La caracterización analítica del etanol y sus congéneres emplea técnicas instrumentales avanzadas (Skoog et al., 2017). La determinación cuantitativa de etanol puede realizarse mediante picnometría (método oficial AOAC), cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), o espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) para análisis rápido no destructivo. Para el perfil completo de congéneres, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) permite la identificación y cuantificación simultánea de cientos de compuestos volátiles y semi-volátiles con límites de detección en el rango de $\mu\text{g/L}$. Compuestos no volátiles como ácidos orgánicos y azúcares residuales se analizan típicamente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detectores de índice de refracción o arreglo de diodos.

El perfil sensorial, aunque subjetivo, es crítico para la aceptación del producto final (Bamforth, 2014). Evaluaciones organolépticas realizadas por paneles entrenados de catadores permiten caracterizar atributos como dulzor, acidez, amargor, y notas aromáticas específicas (frutales, florales, especiadas, etc.). Estas evaluaciones se complementan con análisis instrumentales como la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O), que identifica compuestos individuales responsables de características aromáticas específicas.

La trazabilidad y control de proceso son aspectos esenciales del sistema de calidad. La implementación de buenas prácticas de manufactura (BPM), sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) aseguran la consistencia del producto y la seguridad del consumidor. En el contexto específico de la fermentación, puntos críticos de control incluyen la esterilidad del inóculo, el control de temperatura y pH durante la fermentación, y la eliminación efectiva de congéneres no deseables durante la destilación y rectificación.

2.9 Optimización del proceso: enfoques metodológicos.

La optimización sistemática del proceso fermentativo requiere enfoques metodológicos estructurados que permitan evaluar múltiples variables simultáneamente y determinar condiciones óptimas de operación. El diseño de experimentos representa la herramienta fundamental para este propósito, permitiendo la exploración eficiente del espacio experimental mediante arreglos estadísticamente validados (Montgomery, 2017). Entre las estrategias más utilizadas se encuentran los diseños factoriales completos o fraccionados para identificar efectos principales e interacciones, los diseños de superficie de respuesta como el central compuesto o Box-Behnken para modelar relaciones no lineales, y los diseños de mezclas cuando se optimizan proporciones de componentes.

La metodología de superficie de respuesta (RSM) permite modelar matemáticamente la relación entre variables independientes (factores de proceso) y variables dependientes (respuestas) mediante polinomios de segundo orden: $Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$, donde Y es la respuesta predicha, β_0 es el término constante, β_i son los coeficientes lineales, β_{ii} los coeficientes cuadráticos, β_{ij} los coeficientes de interacción, X_i las variables codificadas, y ε el error experimental (Myers et al., 2016). Este enfoque no solo identifica condiciones óptimas, sino que también cuantifica la importancia relativa de cada factor y sus interacciones.

En el contexto específico de la fermentación para producción de etanol como bebida, las variables independientes típicamente incluyen concentración inicial de sustrato, pH inicial, temperatura de fermentación, tiempo de proceso, y tasa de inóculo. La optimización abarca tanto indicadores de eficiencia (rendimiento de etanol Y_p/s , productividad volumétrica Q_p) como indicadores de calidad, esto es un proceso. Esta optimización multi-objetivo frecuentemente

requiere técnicas de desirabilidad o algoritmos genéticos para encontrar soluciones de compromiso óptimas (Myers et al., 2016).

La optimización también puede abordarse mediante modelado cinético mecanístico, donde se desarrollan sistemas de ecuaciones diferenciales basados en mecanismos bioquímicos conocidos (Bailey & Ollis, 1986). Estos modelos, aunque más complejos de desarrollar y calibrar, ofrecen mayor poder predictivo y comprensión fundamental del proceso. Herramientas de simulación computacional como MATLAB, Python con librerías científicas, o software especializado como SuperPro Designer permiten la implementación y solución de estos modelos.

La validación experimental de las condiciones óptimas predichas es esencial para confirmar la robustez y reproducibilidad del proceso (Montgomery, 2017). Esta validación debe incluir no solo réplicas bajo condiciones óptimas, sino también pruebas en rangos adyacentes para evaluar la sensibilidad del proceso a variaciones menores en los parámetros operativos. Finalmente, la escalabilidad de las condiciones óptimas desde nivel de laboratorio a nivel piloto o industrial requiere consideraciones adicionales de transferencia de masa y calor, homogeneización, y control de proceso que pueden modificar los óptimos determinados a pequeña escala.

3. Antecedentes.

3.1 Contexto Histórico y Evolución Tecnológica

La producción de etanol mediante fermentación representa una de las técnicas más antiguas de la humanidad, con evidencia arqueológica que data del 7000 a.C. en China y del 5400 a.C. en la región de Hajji Firuz en Irán (McGovern et al., 2017). Sin embargo, la comprensión científica del proceso fermentativo se dio en el siglo XIX con la investigación de Louis Pasteur, quien en 1857 demostró que la fermentación alcohólica era causada por microorganismos vivos y no por un

proceso químico espontáneo (Barnett, 2020). A lo largo del siglo XX, la investigación sobre *Saccharomyces cerevisiae* permitió que se iniciara un desarrollo en las cepas industriales especializadas y la optimización de procesos a gran escala. En Colombia, la producción industrial de etanol inició en la década de 1980, principalmente como subproducto de la industria azucarera, evolucionando hacia un sector estratégico que en 2022 produjo aproximadamente 1.65 millones de litros diarios, posicionando al país como el tercer productor en América Latina (Fedebiocombustibles, 2023).

En la última década se han visto avances significativos en la comprensión molecular de la fermentación alcohólica, gracias a diversos estudios genómicos y proteómicos que han revelado la compleja red regulatoria que controla el metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae*, incluyendo sistemas de señalización como la ruta PKA y TOR que relacionan la disponibilidad de nutrientes con la actividad fermentativa (Broach, 2021). Las técnicas de CRISPR-Cas9 han permitido un tratamiento preciso de levaduras para mejorar la tolerancia al etanol, la eficiencia de consumo de sustrato y la resistencia a inhibidores presentes en materias primas no convencionales (Lian et al., 2022). Estas herramientas biotecnológicas ofrecen oportunidades sin precedentes para la optimización racional de procesos fermentativos, aunque su implementación industrial aún enfrenta desafíos regulatorios y de escalabilidad.

3.2 Investigaciones sobre optimización de parámetros de fermentación.

Numerosos estudios han abordado la optimización de parámetros de fermentación para la producción de etanol, empleando diversas metodologías experimentales y de modelado. Zhang et al. (2021) investigaron el efecto de la concentración inicial de sacarosa (10-30% p/v) en el rendimiento fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio sintético, encontrando un porcentaje óptimo de 20% con un rendimiento de 0.48 g etanol/g sacarosa y una productividad de

2.1 g/L/h. Este estudio reveló que concentraciones superiores al 25% causaban inhibición osmótica, lo que reducía la viabilidad celular en un 40% a las 48 horas. Estos valores son similares a investigaciones previas de Bai et al. (2018), quienes reportaron que la presión osmótica generada por altas concentraciones de azúcar activa la ruta de síntesis de glicerol como mecanismo de adaptación, desviando hasta el 15% del carbono del sustrato de la producción de etanol.

La temperatura de fermentación ha sido otro foco de investigación, considerando las implicaciones energéticas del control térmico en procesos industriales. Singh et al. (2020) realizaron un estudio comparativo de fermentación a 25°C, 30°C y 35°C utilizando melaza como sustrato, encontrando que 30°C proporcionaba el mejor balance entre productividad (1.8 g/L/h) y formación de congéneres. Una temperatura de 35°C y superiores incrementaron la productividad inicial, pero aceleraron la pérdida de viabilidad celular después de 24 horas, mientras que, unas temperaturas de 25°C y más bajas extendieron el tiempo de fermentación a 96 horas, pero mejoraron el perfil sensorial del destilado, con un 25% menos de alcoholes superiores. Estos resultados son corroborados por análisis proteómicos de Kumar et al. (2021), los cuales identificaron cambios significativos en las enzimas glucolíticas y de respuesta a estrés térmico, explicando las diferencias encontradas en rendimiento y formación de subproductos.

3.3 Estudios sobre materias primas alternativas.

La búsqueda de materias primas sostenibles y económicas ha motivado investigaciones sobre sustratos alternativos para la producción de etanol. En el contexto colombiano, estudios recientes han explorado el potencial de diversos recursos locales. García et al. (2022) caracterizaron la composición química de melazas de cinco ingenios azucareros del Valle del Cauca, encontrando variaciones significativas en contenido de azúcares (48-55%), sales minerales (8-14%) y compuestos inhibidores. Su investigación demostró que estas diferencias influyen

directamente en el rendimiento fermentativo, con melazas de mayor pureza (55% azúcares, <8% sales) produciendo un 18% más de etanol que melazas de menor calidad. El estudio también evaluó estrategias de pretratamiento, concluyendo que la dilución a 20°Brix combinada con ajuste de pH a 4.5 y suplementación con 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ optimizaba el rendimiento independientemente de la calidad inicial de la melaza.

El mucílago de cacao como materia prima no convencional ha recibido atención creciente en regiones productoras de cacao. Una investigación reciente de Ramírez et al. (2023) evaluó el potencial fermentativo de mucílagos de tres variedades de cacao (Criollo, Forastero y Trinitario) cultivadas en Santander, Colombia. Los resultados mostraron contenidos de azúcares fermentables entre 12-15%, con glucosa como azúcar predominante (6-8%). La fermentación con *Saccharomyces cerevisiae* produjo rendimientos de 0.38-0.42 g etanol/g azúcares, ligeramente inferiores a los obtenidos con melaza (0.45-0.48 g/g), atribuido a la presencia de inhibidores naturales como polifenoles y ácidos orgánicos. Sin embargo, el estudio identificó que la hidrólisis enzimática con pectinasas comerciales incrementaba la disponibilidad de azúcares en un 25% y mejoraba el rendimiento fermentativo a niveles comparables con melaza, abriendo posibilidades para la valorización de este subproducto.

Investigaciones sobre mieles intermedias han sido menos frecuentes, pero igualmente relevantes. Un estudio de López et al. (2021) comparó el rendimiento fermentativo de miel A, miel B y melaza final utilizando una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados mostraron que las mieles intermedias, particularmente la miel A con 65% de sacarosa y menor contenido de sales, producían etanol con menor concentración de congéneres (30% menos de alcoholes superiores) comparado con la melaza. Este hallazgo sugiere ventajas potenciales para la

producción de etanol de alta calidad, aunque el mayor costo de estas mieles frente a la melaza representa una limitación económica que requiere análisis de viabilidad específico.

3.4 Avances en Tecnologías de Separación y Purificación.

La separación y purificación del etanol ha sido objeto de investigación intensiva, particularmente buscando alternativas más eficientes energéticamente que la destilación convencional. Estudios recientes sobre ultrafiltración para la recuperación de etanol han mostrado resultados prometedores. Wang et al. (2022) desarrollaron membranas de polietersulfona modificadas con nanopartículas de grafeno que lograron factores de separación etanol/agua de 4.2 con flujos permeados de 15 L/m²/h a 25°C. Estas membranas mantuvieron estabilidad operativa por más de 200 horas continuas, demostrando viabilidad técnica para procesos a escala piloto. Análisis económicos del mismo estudio estimaron reducciones del 40% en el consumo energético comparado con destilación tradicional, aunque reconocieron desafíos en la limpieza y regeneración de membranas frente a fouling por compuestos orgánicos presentes en mostos fermentados.

La destilación por membranas ha avanzado significativamente con el desarrollo de materiales novedosos. Li et al. (2023) sintetizaron membranas de zeolita tipo MFI (ZSM-5) soportadas en cerámica que alcanzaron selectividades etanol/aguas superiores a 50 con flujos de 2.5 kg/m²/h a 60°C. Estos valores representan mejoras sustanciales frente a membranas poliméricas convencionales y ofrecen el potencial para romper directamente el azeótropo etanol-agua. Sin embargo, los altos costos de fabricación y la sensibilidad a impurezas en la alimentación limitan aún su aplicación industrial a gran escala, particularmente en el contexto de países en desarrollo como Colombia donde las consideraciones económicas son prioritarias. En el ámbito de la destilación convencional, investigaciones recientes han enfocado en mejoras de eficiencia energética. Silva et al. (2022) diseñaron un sistema de destilación por compresión de vapor

acoplado a recuperación de calor que redujo el consumo energético a 1.8 MJ/L de etanol producido, comparado con 2.5-3.5 MJ/L en sistemas convencionales. El sistema, implementado a escala piloto en una destilería brasileña, logró además una reducción del 20% en la formación de congéneres no deseables mediante un control preciso de perfiles de temperatura en la columna. Estos avances son particularmente relevantes para la producción de etanol de calidad potable, donde la pureza y el perfil sensorial son críticos.

3.5 Investigaciones sobre control de calidad y perfil sensorial.

El control de calidad en la producción de etanol para bebidas ha evolucionado desde métodos empíricos tradicionales hacia enfoques científicos basados en análisis instrumental y sensorial. Estudios recientes han aplicado técnicas analíticas avanzadas para caracterizar el perfil de congéneres en destilados. González et al. (2023) utilizaron cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de ultra resolución (UHPLC) para cuantificar 85 compuestos volátiles y semi-volátiles en muestras de etanol producido a partir de melaza bajo diferentes condiciones de fermentación. Su investigación identificó correlaciones significativas entre parámetros de proceso (pH, temperatura, tiempo) y la formación de congéneres específicos, particularmente ésteres de cadena corta (acetato de etilo, acetato de isoamilo) y alcoholes superiores (1-propanol, 2-metil-1-butanol). Estas correlaciones permitieron desarrollar modelos predictivos que relacionan condiciones operativas con características sensoriales.

La evaluación sensorial científica ha ganado importancia en la caracterización de destilados. Un estudio comprehensivo de Rodríguez et al. (2022) formó un panel entrenado de 12 catadores para evaluar muestras de etanol producidas bajo 16 combinaciones diferentes de pH (4.0-5.5) y temperatura (25-35°C). Los resultados, analizados mediante Análisis de Componentes Principales (PCA), mostraron que muestras producidas a pH 4.5-5.0 y 28-32°C recibieron las

calificaciones más altas en atributos como "suavidad" y "pureza", mientras que condiciones extremas (pH <4.0, temperatura >33°C) produjeron percepciones negativas de "picante" y "medicinal". El estudio correlacionó estas percepciones sensoriales con concentraciones cuantitativas de congéneres medidas por GC-MS, validando la relación entre parámetros de proceso, composición química y calidad sensorial.

Investigaciones sobre detección y control de contaminantes también han avanzado. Martínez et al. (2021) desarrollaron un método analítico basado en espectroscopía Raman acoplada a quimiometría para la detección rápida (<5 minutos) de metanol en etanol con límite de detección de 0.1% v/v. Esta técnica, comparada favorablemente con métodos cromatográficos tradicionales que requieren 20-30 minutos por análisis, ofrece potencial para monitoreo en línea en procesos industriales, permitiendo ajustes en tiempo real para mantener la calidad y seguridad del producto. Estudios similares han abordado la detección de otros contaminantes como furfural, acetaldehído y metales pesados, desarrollando métodos sensibles y selectivos apropiados para el control de calidad en destilerías.

3.6 Estudios de Optimización Multivariable Aplicados a Fermentación.

La aplicación de metodologías estadísticas avanzadas para la optimización de procesos fermentativos ha sido un área de investigación activa en la última década. El Diseño de Experimentos (DoE) y la Superficie de Respuesta (RSM) han demostrado su eficacia para identificar condiciones óptimas considerando múltiples variables simultáneamente. Un estudio reciente de Oliveira et al. (2022) empleó un diseño central compuesto (CCD) para optimizar la fermentación de sacarosa con *Saccharomyces cerevisiae*, evaluando cinco variables independientes: concentración de sustrato (15-25%), pH (4.0-5.0), temperatura (28-34°C), tasa de inóculo (5-15%) y tiempo (48-96 horas). El modelo de segundo orden desarrollado explicó el 94%

de la variabilidad en el rendimiento de etanol, identificando interacciones significativas entre temperatura y pH, y entre concentración de sustrato y tiempo. Las condiciones óptimas predichas (20% sacarosa, pH 4.8, 30°C, 10% inóculo, 72 horas) fueron validadas experimentalmente con un rendimiento de 0.49 g/g, cercano al valor predicho de 0.51 g/g.

Enfoques de optimización multi-objetivo han ganado relevancia para procesos donde múltiples respuestas deben ser optimizadas simultáneamente. Chen et al. (2023) aplicaron la metodología de Desirabilidad Global para optimizar la producción de etanol desde melaza considerando tres objetivos contradictorios: maximizar rendimiento (Y_p/s), maximizar productividad (Q_p) y minimizar formación de alcoholes superiores. Utilizando un diseño Box-Behnken con tres factores (pH, temperatura, concentración), desarrollaron funciones de desirabilidad individuales para cada respuesta y calcularon una función de desirabilidad global (D) que varió de 0.75 a 0.91 bajo diferentes condiciones. La condición óptima (pH 4.6, 31°C, 18% azúcares) logró un compromiso satisfactorio con $D=0.88$, produciendo 0.46 g/g de rendimiento, 1.9 g/L/h de productividad, y 280 mg/L de alcoholes superiores totales.

4. Materiales y metodología.

4.1 Materiales y reactivos.

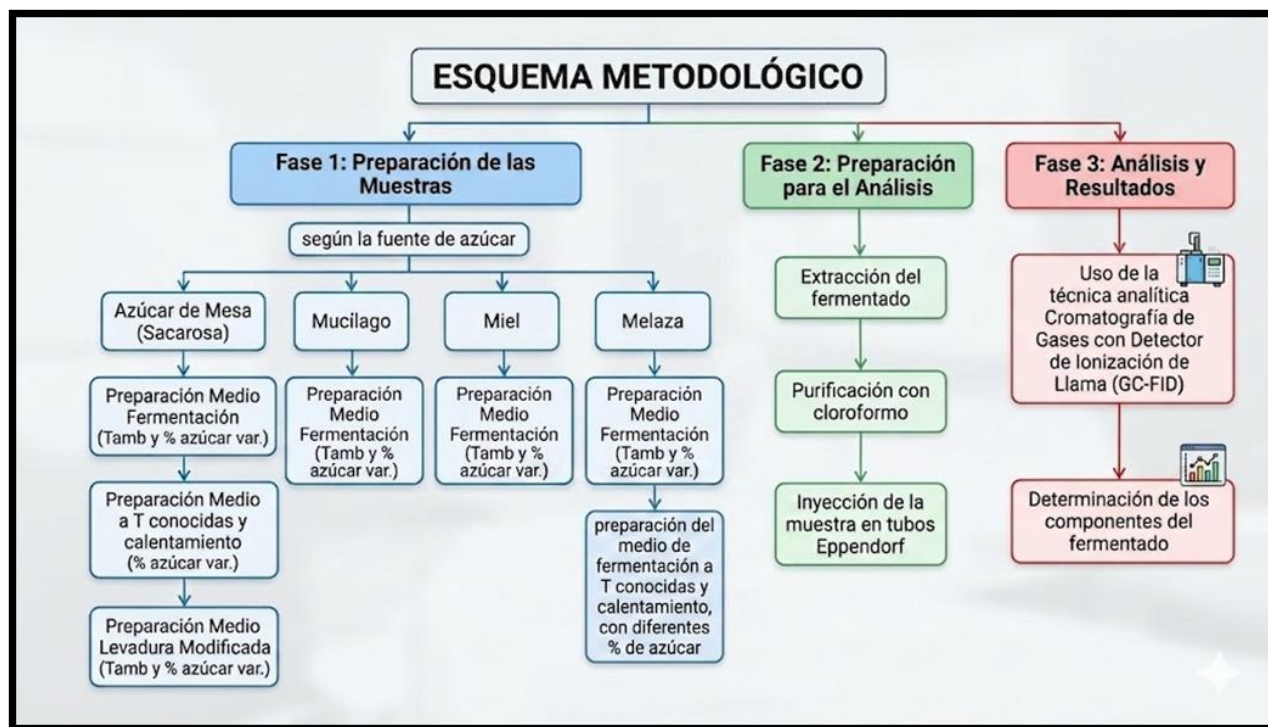
Se emplearon diversos reactivos y sustratos de grado alimenticio, analítico y comercial. Como fuentes de carbono principales y sustratos de fermentación, se utilizó sacarosa con una pureza mayor o igual al 99.5%, melaza y mucílago de cacao. El proceso de fermentación y los ensayos microbiológicos se llevaron a cabo utilizando dos agentes biológicos: levadura seca activa (*Saccharomyces cerevisiae*) y la levadura comercial especializada Lalvin EC-1118. Las diluciones, la preparación de medios de cultivo y en las mezclas se empleó agua potable

previamente caracterizada, con valores de conductividad eléctrica inferiores a 1 mS/cm, garantizando condiciones adecuadas para la preparación de los medios fermentativos, (marcas Glacial y OMI). Finalmente, para los procedimientos analíticos y de cuantificación, se dispuso de estándares de referencia con etanol y metanol con una pureza mayor o igual al 99.8% funcionales para cromatografía, además de cloroformo de grado analítico.

4.2 Metodología.

Figura 5.

Esquema metodológico.



4.2.1 Etapa 1: Evaluación base del proceso fermentativo a temperatura ambiente con diferentes fuentes de carbono.

En esta fase se estableció la línea base del proceso fermentativo empleando sacarosa, miel, melaza y mucílago de cacao como sustrato carbonado y una cepa comercial de levadura

(*Saccharomyces cerevisiae*). El objetivo fue analizar el efecto de la concentración inicial de sustrato (15, 20 y 25% p/v) y de biomasa (1, 2 y 3% p/v correspondiente a 8, 16 y 24 g/800 ml respectivamente) sobre la producción de etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) bajo condiciones ambientales (24 ± 2 °C), permitiendo identificar comportamientos cinéticos del sistema antes de experimentar con diferentes variables para conseguir la optimización.

4.2.1.1 Preparación del sistema reactivo, detalle técnico.

Se inició el procedimiento midiendo 400 ml de agua destilada utilizando una probeta graduada, volumen que posteriormente fue transferido a un vaso de precipitados de 1 L. A continuación, bajo agitación constante empleando una varilla de vidrio, se adicionó gradualmente la cantidad correspondiente de los sustratos carbonados, con el propósito de evitar acumulaciones locales de soluto y favorecer una adecuada solubilización. La mezcla se mantuvo en agitación continua hasta lograr la disolución homogénea, evidenciada por la obtención de una solución completamente transparente y libre de partículas visibles. Finalmente, se realizó el ajuste del volumen final a 800 ml mediante la adición del agua previamente mezclada con la levadura, teniendo en cuenta que la incorporación de fuente de carbono genera un ligero incremento en el volumen total, monitoreando cuidadosamente que el volumen final no superara los 800 ml establecidos en el procedimiento experimental.

Las soluciones de fuente de carbono fueron preparadas bajo el criterio de porcentaje peso/volumen (% p/v), definido como gramos de soluto por cada 100 ml de solución final. Para un volumen final de 800 ml por unidad experimental, utilizando la siguiente ecuación:

$$m_{\text{sacarosa(g)}} = \frac{\%p/v}{100} \times V_{\text{final}}(\text{mL}) \quad (1)$$

Tabla 1.*Concentraciones y masa.*

Concentración (% p/v)	Masa de fuente de carbono (g) para 800 ml
15	120
20	160
25	200

4.2.1.2 Diseño experimental.

Aunque la investigación se centró en el uso de sacarosa (azúcar comercial) como fuente de carbono para evaluar el proceso de fermentación y producción de etanol por parte de *Saccharomyces cerevisiae*; de manera complementaria se realizaron ensayos adicionales empleando otras fuentes de azúcares fermentables, estos experimentos paralelos tuvieron como finalidad comparar el comportamiento metabólico del microorganismo frente a diferentes sustratos, analizar posibles variaciones en la eficiencia fermentativa y obtener una visión más amplia sobre la influencia de la fuente de carbono en el rendimiento global del proceso de producción de etanol.

Tabla 2.*Lotes experimentales.*

Condiciones del fermentado			
Lote	Fuente de azúcar	(%p/v)	% Levadura
1.1	Azúcar	15	1
1.2	Azúcar	20	1
1.3	Azúcar	25	1
2.1	Azúcar	15	1
2.2	Azúcar	20	1
2.3	Azúcar	25	1
3.1	Azúcar	15	2
3.2	Azúcar	20	2
3.3	Azúcar	25	2
4.1	Azúcar	15	2
4.2	Azúcar	20	2
4.3	Azúcar	25	2
5.1	Azúcar	15	3
5.2	Azúcar	20	3
5.3	Azúcar	25	3
1.1 M	Miel	15	1
1.2 M	Miel	20	1
1.3 M	Miel	20	1
1.1 C	M. Cacao	17	1
1.2 C	M. Cacao	10	1
1.3 C	M. Cacao	20	1
1.4 C	M. Cacao	25	1
2.1 C	M. Cacao	15	2
1.1 MLZ	Melaza	16	2

Para el seguimiento y optimización del proceso, las variables medidas incluyeron la concentración final de etanol (% v/v), el tiempo total de fermentación contabilizado hasta el cese completo de la producción de CO₂.

4.2.1.3 Preparación del material biológico – procedimiento estandarizado.

La levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, en presentación de barra, fue sometida a un proceso de hidratación previo siguiendo un protocolo escalonado con el fin de garantizar la viabilidad celular antes de iniciar la fermentación; inicialmente, se pesaron 8 g, 16 g y 24 g de levadura seca, según el lote correspondiente, empleando una balanza analítica; posteriormente, cada muestra fue transferida a un vaso de precipitados independiente que contenía 400 ml de agua potable a temperatura ambiente, realizando una agitación suave con varilla de vidrio para favorecer la dispersión homogénea del material biológico, seguidamente, la suspensión se dejó en reposo durante 10 minutos sin agitación, permitiendo la rehidratación pasiva de las células; durante este periodo, la membrana celular recuperó progresivamente su permeabilidad selectiva y se reactivaron sistemas de transporte de membrana; la rehidratación en ausencia de sustrato fue un paso crítico, ya que evitó un choque osmótico brusco que podría generar efectos negativos como plasmólisis celular por pérdida de agua citoplasmática, desnaturalización de enzimas intracelulares clave en la fermentación, por lo tanto, esta separación inicial entre biomasa y sustrato respondió a la necesidad de impedir que la levadura seca entrara en contacto directo con soluciones hipertónicas de sacarosa (% p/v) antes de que la membrana plasmática recuperara completamente su función como barrera osmótica, garantizando las condiciones fisiológicas óptimas para el inicio del proceso fermentativo.

4.2.1.4 Mezcla del sistema fermentativo.

Una vez obtenidas ambas soluciones homogéneas la sacarosa disuelta en 400 ml y la levadura disuelta en otros 400 ml, se combinaron en la botella de plástico de 1 L con cierre hermético.

La transferencia se realizó mediante embudos de vidrio previamente enjuagados con agua destilada, se vertió primero la solución de levadura hidratada en la botella, seguida de la solución de sacarosa. Posteriormente, se realizó una agitación suave para garantizar distribución uniforme.

4.2.1.5 Montaje del sistema anaerobio.

La botella fue sellada herméticamente con su tapa de rosca modificada. Se conectó una manguera de silicona (se usó un equipo de macrogoteo) desde el orificio hasta una botella de plástico de 500 ml que contenía 350 ml de agua. El extremo de la manguera se sumergió 2 cm por debajo de la superficie del agua.

El funcionamiento del sello hidráulico se basa en un gradiente de presión y una barrera líquida: el CO_2 generado de forma continua por el metabolismo de la levadura incrementa la presión interna en el reactor, forzando al gas a burbujear a través del agua para escapar de manera segura al ambiente. Al mismo tiempo, esta columna de agua actúa como una válvula de retención unidireccional y una barrera física hermética, aislando por completo el sistema y previniendo cualquier reflujo o ingreso de oxígeno (O_2) molecular desde el exterior hacia el medio de cultivo.

Figura 6.

Montaje del sistema anaerobio.



4.2.1.6 Condiciones de fermentación – monitoreo.

El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente (26 ± 2 °C), medido con un termómetro de mercurio que se insertaba en dentro del sello de la botella y certificando cada cierto tiempo que las condiciones fueran las mismas. No se aplicó agitación continua; la única mezcla fue la inicial.

Las variables monitoreadas fueron: Cambios en la trampa de salida, cambios visuales internos dentro del reactor como turbidez, sedimentación de levadura o espuma, además, se monitoreo la temperatura.

4.2.1.7 Criterio de finalización del proceso.

El proceso se consideró finalizado cuando cesó completamente la producción de CO₂, definido operacionalmente como: cero burbujas en la trampa de CO₂, adicionalmente, se verificó la ausencia de efervescencia al agitar suavemente la botella.

4.2.1.8 Clarificación y extracción del fermentado.

Las botellas se dejaron en reposo aproximadamente 2 días después de la finalización del burbujeo, permitiendo la sedimentación natural de la biomasa (células de levadura muertas y viables) por gravedad. Este tiempo fue suficiente para observar una separación clara de fases: una fase líquida superior (sobrenadante) que contenía etanol y azúcares residuales, y un sedimento inferior (levadura + partículas sólidas); a continuación, con una jeringa estéril de 10 ml acoplada a una aguja de calibre 18, se extrajo el sobrenadante desde la superficie, evitando aspirar el sedimento. La extracción se realizó con la botella inclinada para maximizar la recuperación de líquido clarificado; además, el fermentado recolectado se transvasa a una nueva botella limpia y esterilizada para garantizar que este se mantenga sin contaminantes; así mismo, de este se toman muestras en tubos eppendorf y se sellan evitando perdidas por evaporación del etanol, estos son etiquetados con lote indicando la muestra del fermentado producido; finalmente, este, se transfirió

a viales de vidrio ámbar de 10 ml con cierre hermético, etiquetados con el código de lote y fecha, y se almacenaron a 4 °C hasta el momento del análisis para evitar pérdidas de etanol por evaporación.

4.2.1.9 Análisis de etanol con el método de cromatografía de gases (GC) – extracción líquido-líquido con cloroformo.

4.2.1.9.1 Extracción líquido-líquido.

La matriz fermentativa cruda contiene, además de etanol, una compleja mezcla de compuestos no volátiles y semivolátiles que pueden interferir en el análisis cromatográfico, tales como: azúcares residuales (sacarosa no consumida, glucosa y fructosa provenientes de la hidrólisis enzimática), sales minerales (provenientes de la levadura comercial), proteínas y péptidos (lisados celulares), glicerol (subproducto de la fermentación) y ácidos orgánicos (ácido acético y pirúvico); en consecuencia, los azúcares residuales, pueden causar que se carbonice la muestra debido al inyector caliente del GC, se puede obstruir la columna capilar reduciendo su vida útil, solaparse los picos con el etanol, producir colas asimétricas en los picos cromatográficos, afectando la cuantificación.

Para poder eliminar estos residuos, se implementó una extracción líquido-líquido (LLE) utilizando cloroformo (CHCl_3) como solvente orgánico; el cual posee estas características: una densidad de 1.489 g mL^{-1} a 20 °C, lo que le permite formar una fase inferior en mezclas con agua, ayudando a la recuperación de la fase acuosa superior durante los procesos de extracción y purificación. Su constante dieléctrica ($\epsilon = 4.81$) refleja una baja polaridad, haciéndolo adecuado para disolver compuestos moderadamente polares, posee un punto de ebullición de 61.2 °C, lo cual lo hace lo suficientemente volátil para eliminarse por evaporación suave y, además, no interfiere

con la señal del etanol en cromatografía de gases (GC) gracias a su diferente tiempo de retención. Por último, su baja miscibilidad con agua (0.8 g/100 mL a 20 °C) garantiza la formación de una interfase clara y estable, esencial para una separación eficiente de fases en protocolos de purificación con cloroformo.

De cada lote experimental, se extrajo cuidadosamente 2.0 ml del sobrenadante clarificado (descrito en sección 4.2.1.8) usando una micropipeta con punta de 1000 μ L (dos tomas de 1000 μ L). La alícuota se transfirió a un vial de vidrio de 5 ml con tapa de rosca. Se trabajó con vial por muestra para evaluar la repetibilidad de la extracción; adicionalmente, se añadieron 1.0 ml de cloroformo grado analítico a cada vial que contenía los 2.0 ml de fermentado. La relación volumétrica fue fermentado:cloroformo = 2:1, por otro lado, los viales fueron cerrados herméticamente (tapa de rosca) y se agitaron manualmente durante 30 segundos con un movimiento rotacional constante, después, se dejaron en reposo durante 5–10 minutos en posición vertical, a temperatura ambiente (26 ± 2 °C), sin agitación, a continuación, con una jeringa estéril de 1 ml acoplada a una aguja, se abrió el vial y se introdujo la aguja hasta la mitad de la fase acuosa superior, teniendo cuidado de no tocar la interfase ni penetrar en la fase orgánica. Se aspiraron lentamente 1.8–2.0 ml de la fase acuosa superior; finalmente, el contenido recogido (aproximadamente 1.8–2.0 ml de fase acuosa purificada) se transfirió inmediatamente a un vial ámbar de 2 ml con septo de PTFE/silicón.

Todos los viales se almacenaron en posición vertical dentro de un refrigerador, protegidos de la luz. El análisis por GC se realizó dentro de las 24 horas posteriores a la extracción para minimizar pérdidas de etanol por evaporación.

4.2.1.9.2 Análisis por cromatografía de gases (GC-FID).

El análisis se realizó inyectando 1 μL de la fase acuosa superior obtenida post-extracción en el cromatógrafo de gases. El inyector se mantuvo a 220 °C trabajando en modo split 1:20. Se empleó helio como gas portador a un flujo constante de 1.2 ml min^{-1} . La separación se llevó a cabo en una columna capilar DB-WAX (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm); el horno siguió una rampa de temperatura que partió de 40 °C mantenidos durante 2 minutos, aumentando luego a 10 °C min^{-1} hasta alcanzar 200 °C. Para finalizar, se utilizó un detector de ionización de llama (FID) a 250 °C.

A pesar de que la muestra aún contiene agua (aproximadamente 95–98%), la columna DB-WAX (polietilenglicol) es compatible con inyecciones de muestras acuosas en pequeñas cantidades. El agua se eluye rápidamente (tiempo de retención $\approx$ 1.2 min), muy antes que el etanol ($\approx$ 2.8–3.2 min), sin afectar la separación. La extracción previa con cloroformo eliminó los interferentes que sí dañan la columna (azúcares, sales, proteínas), permitiendo inyecciones limpias y repetibles.

Curva de calibración: Se prepararon patrones de etanol en agua a concentraciones de, 5, 10, 15 y 20% v/v a partir de etanol absoluto ($\geq$ 99.8%). Se inyectaron por triplicado y se construyó la curva de calibración (área vs. concentración). El coeficiente de determinación (R^2) mínimo aceptado fue $\geq$ 0.995.

Cuantificación de metanol (posible trazabilidad): La presencia de metanol fue evaluada comparando los tiempos de retención de la muestra con un patrón de metanol al 0.5% v/v. En fermentaciones de sacarosa con *Saccharomyces cerevisiae*, no se espera metanol (este se produce por hidrólisis de pectinas en fermentaciones de frutas). Cualquier pico en el tiempo de retención del metanol se reportó como "trazas no cuantificables" o "ausente".

4.2.2 Etapa 2: Evaluación del proceso fermentativo a temperaturas controladas.

En esta segunda fase experimental se evaluó el efecto que tiene la temperatura sobre la cinética fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando sacarosa como unico sustrato, utilizando las mismas condiciones que en la primera parte; 15, 20 y 25% p/v de concentración de azúcar y 1, 2 y 3% p/v de biomasa inicial, la diferencia principal en esta etapa fue, que se implementó un sistema de calentamiento por baño maría para mantener condiciones isotérmicas en: 30 °C y 35 °C.

La selección de estas temperaturas responde a que 30 °C se sitúa en el rango óptimo documentado (28–32 °C) para el crecimiento y rendimiento metabólico de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que 35 °C actúa como un límite superior de tolerancia que somete a la levadura a un estrés térmico moderado, permitiendo evaluar la resistencia del sistema ante fluctuaciones térmicas y los efectos críticos de la temperatura sobre la viabilidad celular y la actividad enzimática.

4.2.2.1 Diseño experimental.

Se implementaron dos experimentos independientes (Parte 2A y Parte 2B), cada uno correspondiente a una temperatura de incubación controlada. Para cada temperatura, se mantuvo el mismo diseño factorial empleado en la sección anterior, con la diferencia de que no se realizaron réplicas independientes.

Tabla 3.

Diseño experimental para la etapa de fermentado con control de temperatura.

Condiciones del fermentado				
Lote	Fuente de azúcar	(%p/v)	% Levadura	Temperatura °C
1.1 T	Azúcar	15	1	30
1.2 T	Azúcar	20	1	30
1.3 T	Azúcar	25	1	30
1.4 T	Azúcar	15	2	30
1.5 T	Azúcar	20	2	30
1.6 T	Azúcar	25	2	30
2.1 T	Azúcar	15	2	35
2.2 T	Azúcar	20	2	35
2.3 T	Azúcar	25	2	35

4.2.2.2 Montaje del sistema con control de temperatura en baño maría.

4.2.2.2.1 Montaje del sistema anaerobio.

Se efectuó el mismo procedimiento de la sección 4.2.1.5.

4.2.2.2.2 Configuración del baño termostático.

El baño María se encendió con al menos 30 minutos de antelación al inicio de cada experimento para asegurar que la totalidad del agua se encontrara a la temperatura deseada. El termostato se programó y se verificó con un termómetro de mercurio sumergido en el centro del baño. Se consideró temperatura estable cuando la fluctuación fue $\leq \pm 0.5$ °C durante 15 minutos continuos.

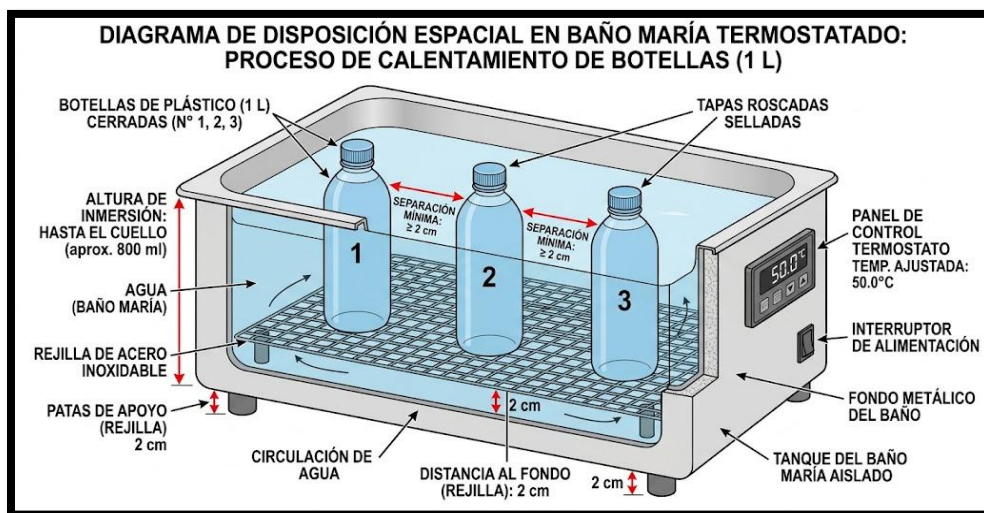
El volumen de agua en el baño, se mantuvo un nivel de agua que cubriera al menos 2/3 del volumen de las botellas con la mezcla, permitiendo una transferencia de calor eficiente por convección.

4.2.2.2.3 Inmersión y fijación de las botellas en el baño maría.

Cada botella de plástico de 1 L cerrada con su respectiva tapa se colocó cuidadosamente dentro del baño María termostatado, sumergido hasta la altura del cuello (aproximadamente 800 ml de inmersión). Para evitar el contacto directo con el fondo metálico del baño (que puede presentar puntos calientes con temperatura superior a la programada), las botellas se apoyaron sobre una rejilla de acero inoxidable elevada 2 cm por encima del fondo.

Figura 7.

Diagrama de baño maría.



4.2.2.2.4 Monitoreo de temperatura durante la fermentación.

Para registrar la temperatura durante el proceso, se implementó una doble estrategia de monitoreo: por un lado, se controló la temperatura del agua del baño maría en tres momentos clave (al inicio, a los tres días y al finalizar la fermentación); por otro lado, se dispuso un montaje de prueba testigo, consistente en una botella adicional con 800 ml de agua colocada en el mismo baño, equipada con un termómetro insertado a través de un septo en la tapa, lo que facilitó la lectura en tiempo real de la temperatura interna del líquido sin necesidad de abrir ni alterar las botellas experimentales.

4.2.2.3. Monitoreo de la actividad fermentativa.

La actividad metabólica de la levadura se monitoreó mediante la observación de burbujas de CO₂ en la trampa hidráulica, además de observaciones cualitativas como: formación de espuma en el reactor (indicador de alta actividad), coloración del medio (inicial: amarillo pálido; final: más oscuro por acumulación de productos de desecho), sedimentación visible de la levadura o eventual obstrucción de la manguera o disminución abrupta del burbujeo.

4.2.2.4 Criterio de finalización del proceso.

Se aplicó el mismo criterio definido en la parte 1, sección 4.2.1.7.

4.2.2.5 Clarificación, extracción y purificación de muestras.

4.2.2.5.1 Sedimentación y recuperación del sobrenadante.

Una vez finalizado el tratamiento térmico, las botellas fueron retiradas cuidadosamente del baño maría y se dejaron enfriar. Este periodo de enfriamiento tuvo como finalidad garantizar una manipulación segura del material evitando posibles quemaduras, reducir la presión interna generada por la expansión térmica del aire presente en el espacio de cabeza (*headspace*) y favorecer la sedimentación de la biomasa debido a la disminución de los fenómenos de convección

térmica dentro del sistema. Posteriormente, una vez alcanzadas condiciones más estables, se procedió a aplicar el mismo protocolo experimental previamente descrito en la sección 4.2.1.8, manteniendo las mismas condiciones y parámetros establecidos para la continuidad del proceso experimental.

4.2.2.5.2 Purificación de muestras por extracción líquido-líquido con cloroformo.

Se siguió exactamente el protocolo descrito en la sección 4.2.1.9.1.

4.2.2.5.3 Almacenamiento de muestras purificadas.

Los viales ámbar de 2 ml conteniendo la fase acuosa purificada se almacenaron a 4 °C en posición vertical, protegidos de la luz, hasta su análisis por cromatografía de gases.

4.2.2.6 Análisis de etanol con el método de cromatografía de gases (GC-FID).

Se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas descritas en la sección 4.2.1.9.2 de la parte 1.

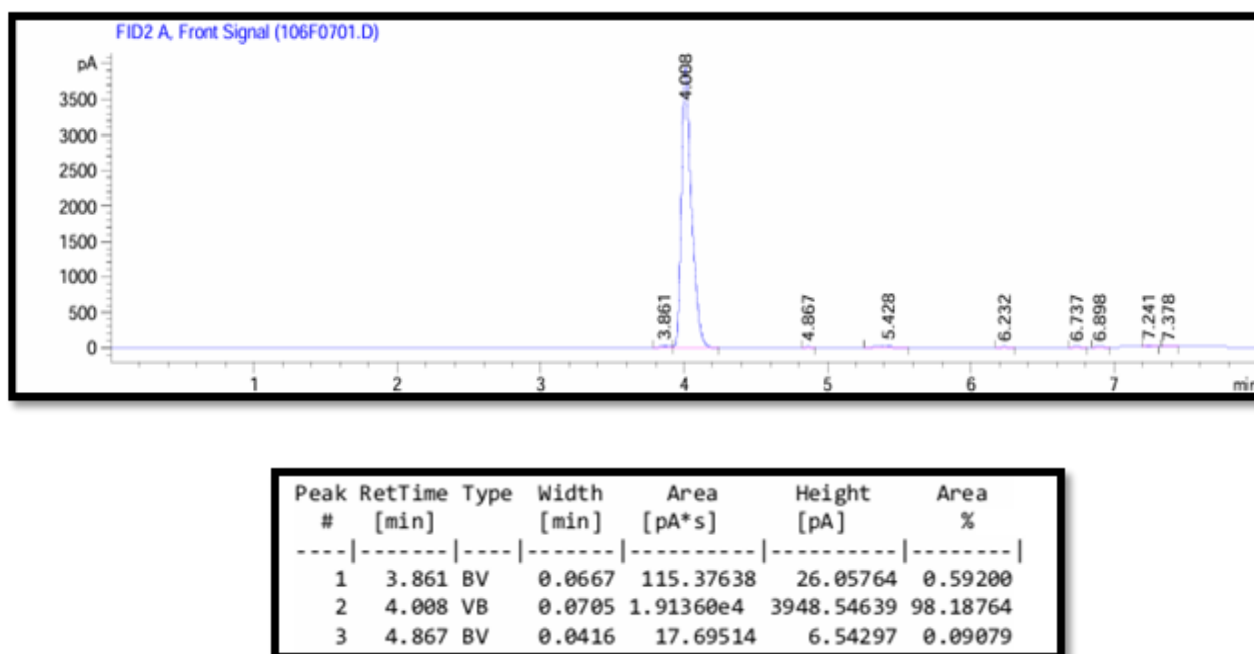
5. Resultados, análisis y discusión.

5.1 Cromatogramas (FID) para caracterización de compuestos y cuantificación de etanol.

5.1.1 Fase 1: temperatura ambiente y sacarosa.

Figura 8.

Cromatograma y reporte del lote 1.2 (20% azúcar, 1%levadura, T ambiente).

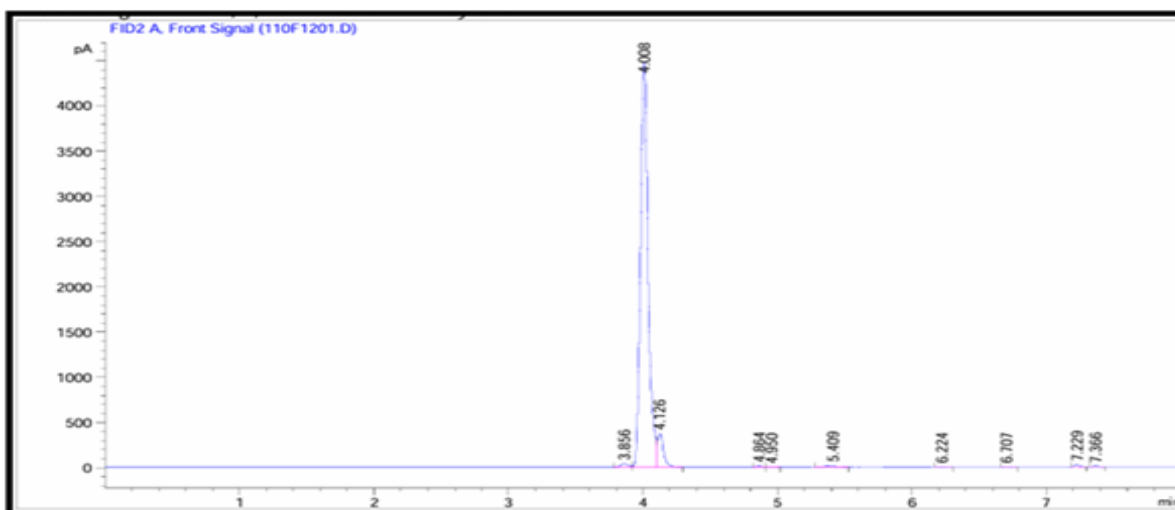


El cromatograma obtenido mediante GC-FID mostró un perfil característico de fermentación alcohólica predominando el etanol. Se observó un pico principal a un tiempo de retención de 4.008 min con un porcentaje de área de 98.19% y una alta conversión de la sacarosa fermentable. Los demás picos detectados presentaron áreas relativas inferiores al 1%, lo que indica una baja formación de compuestos secundarios durante el proceso. Entre estos se destacan pequeñas señales asociadas posiblemente a alcoholes superiores o metabolitos secundarios. Así mismo, los picos que probablemente se podrían asociar a la presencia de altas concentraciones de metanol no son significativos. En resumen, el perfil cromatográfico evidencia una fermentación

eficiente y altamente selectiva hacia la producción de etanol utilizando sacarosa como sustrato fermentable.

Figura 9.

Cromatograma y reporte del lote 5.2 (20%azucar, 3% levadura, T ambiente.)



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.856	BV	0.0640	166.24934	40.38034	0.85595
2	4.008	VV	0.0616	1.78642e4	4476.34326	91.97520
3	4.126	VB	0.0445	1132.71045	372.46841	5.83184

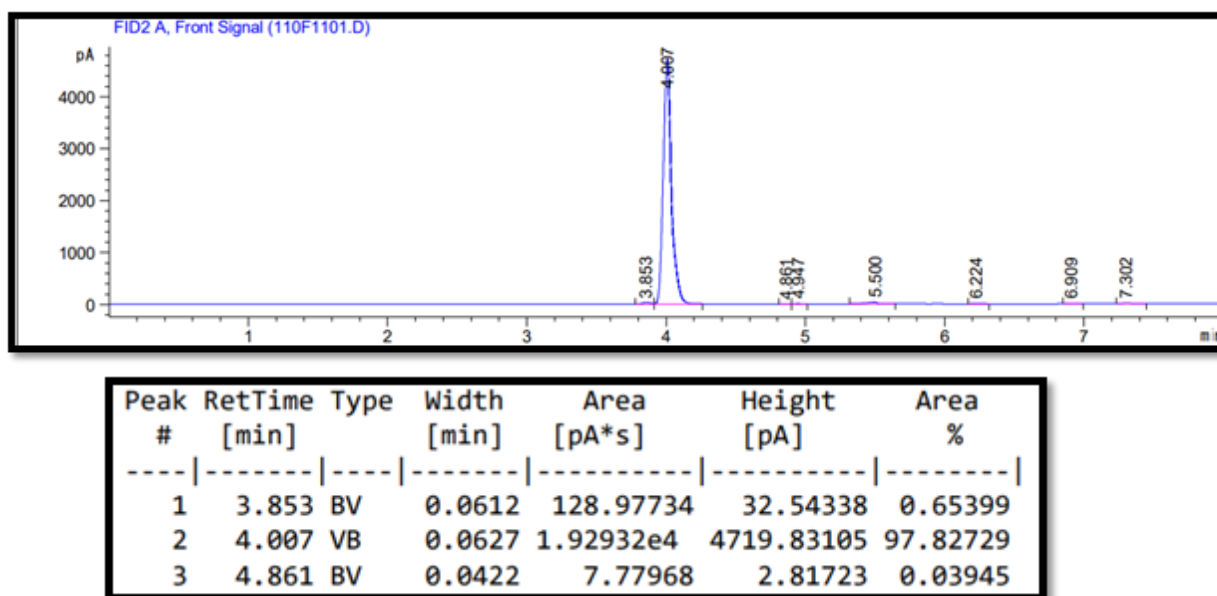
Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 5.2, preparada con Levapan, sacarosa al 20% p/v, 3% de levadura y temperatura ambiente. Este cromatograma muestra un pico de etanol a 4.008 minutos que alcanza el 91.98% del área total de compuestos orgánicos detectados, y una relación etanol:alcohol superior de 15.77:1. El alcohol superior que se encuentra a 4.126 minutos representa solo el 5.83% del área total. Este desempeño excepcional demuestra que, una concentración de 20% p/v de sacarosa combinada con una dosis alta de levadura (3%) a temperatura ambiente puede producir una fermentación altamente eficiente, con mínima formación de alcoholes superiores. Se puede concluir que en ocasiones el estrés osmótico asociado al 20%

de azúcar puede ser compensado por una mayor densidad de inóculo (3%), permitiendo que la levadura alcance una selectividad excepcional hacia etanol.

5.1.2 Resultados fase 2: Temperatura controlada y sacarosa.

Figura 10.

Cromatograma y reporte del lote 1.5T (20% azúcar, 2%levadura, 30°C.)

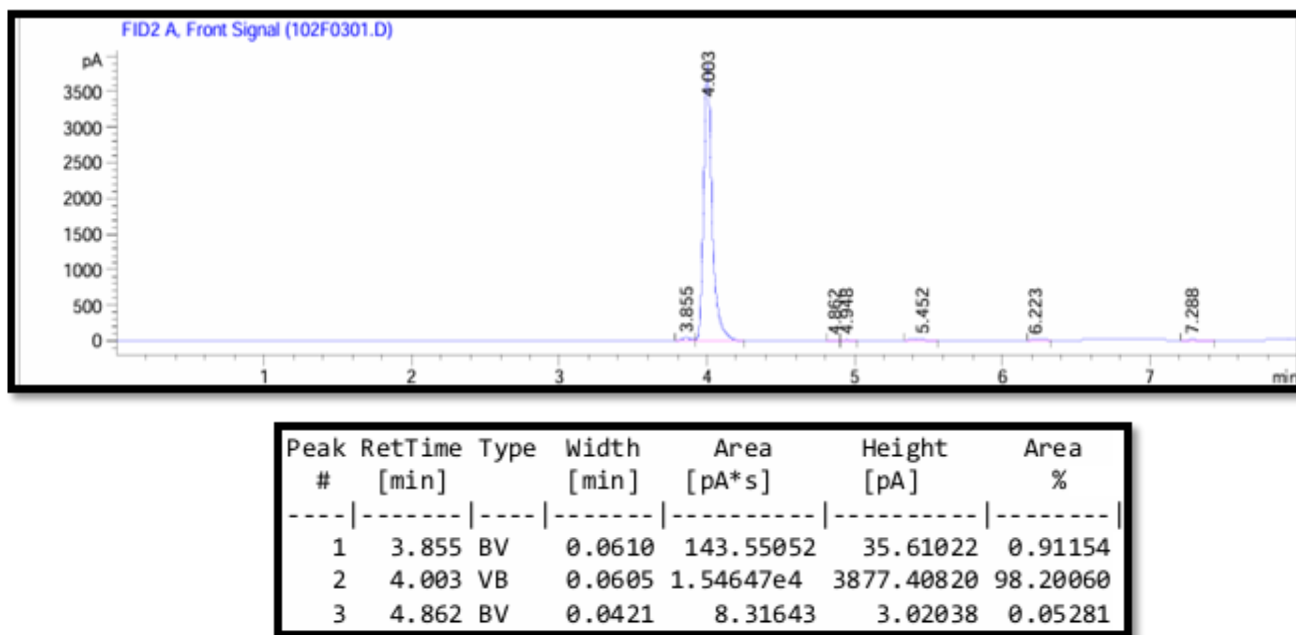


Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.5T, preparada con Levapan, sacarosa al 20% p/v, 2% de levadura y temperatura controlada de 30°C. Este es el mejor resultado de toda la Parte 2, con un pico de etanol a 4.007 minutos que alcanza un área de 19,293 pA·s, constituyendo el 97.83% del área total de compuestos orgánicos detectados, un valor excepcionalmente alto que indica una selectividad prácticamente total hacia la producción de etanol. Los 6 picos restantes suman menos del 2% del área total. Este desempeño sobresaliente demuestra que la combinación de 20% de azúcar añadiendo otro 8g más de levadura (2%) y 30°C alcanza una condición excelente, muy similar a la del cromatograma 1.2, es decir que la condición óptima de sustrato es

20% y si se va a trabajar bajo temperatura controlada, lo ideal sería aumentar la dosis de levadura; por lo tanto, para la fermentación con levadura levapan, las muestras 1.2 y 1.5T (de diferentes fases experimentales) alcanzan valores muy superiores al resto de las muestras analizadas.

Figura 11.

Cromatograma y reporte del lote 2.1T (15% azúcar, 2%levadura, 35°C).



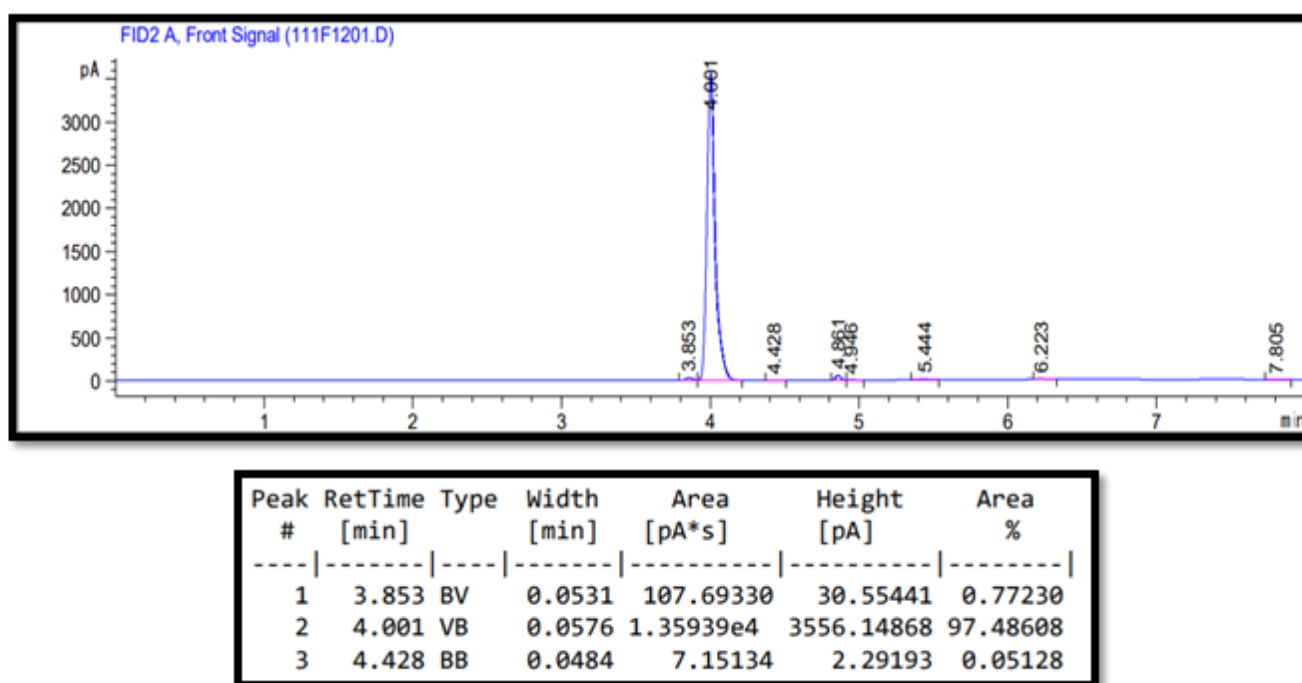
Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 2.1T, preparada con Levapan, sacarosa al 15% p/v, 2% de levadura y temperatura controlada de 35°C (Parte 2), muestra un desempeño bastante alto, con el pico de etanol a 4.003 minutos alcanzando un área de 15,465 pA·s, que representa el 98.20% del área total de compuestos orgánicos detectados, el valor más alto registrado en toda la Parte 2, superando incluso a la excelente muestra 1.5T (97.83% a 30°C). Los 5 picos restantes suman menos del 1% del área total. Este resultado es muy valioso puesto que demuestra que a 35°C (condición de estrés térmico para muchas levaduras), la cepa Levapan no solo tolera la temperatura, sino que alcanza su máxima selectividad hacia etanol (98.2%) cuando

se combina con concentraciones moderadas de azúcar (15%) y dosis adecuada de inóculo (2%). Esta observación es útil para procesos donde el control de temperatura a 30°C puede ser tedioso, permitiendo operar a 35°C sin pérdida de eficiencia.

5.1.3 Resultados Fase 3: Temperatura ambiente y miel.

Figura 12.

Cromatograma y reporte del lote miel 1.3 (20% miel, 1%levadura, T ambiente).



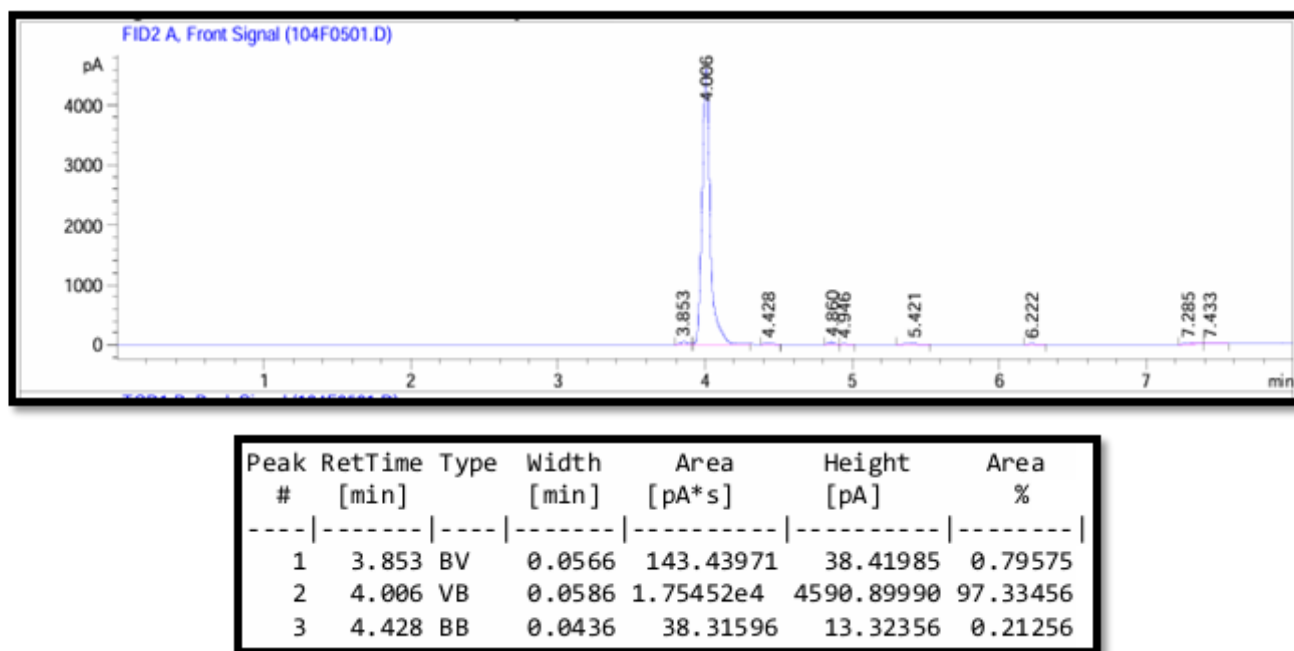
Cromatogramas de gases (GC-FID) de las muestras 1.2M y 1.3M, preparadas con miel de abejas al 20% p/v, 1% de Levapan y temperatura ambiente (Fase 3). Ambas muestras presentan un desempeño alto y consistente: la 1.2M muestra un pico de etanol a 4.000 minutos con un área de 12,713 pA·s que representa el 97.11% del área total, mientras que la 1.3M presenta un pico a 4.001 minutos con un área de 13,594 pA·s que alcanza el 97.49% del área total. Un resultado notable es la ausencia del pico adicional grande que aparecía en la muestra 1.1M con 15%, lo que sugiere que utilizando 20% de miel como sustrato consigue una fermentación más limpia y

selectiva. Estos valores son comparables a los mejores resultados obtenidos con sacarosa en la parte 2 (30-35°C, 97-98% de etanol), demostrando que la miel al 20% con 1% de levadura a temperatura ambiente es una combinación altamente eficiente para la producción de etanol y que aumentar la cantidad de sustrato en tan solo un 5% consigue resultados excepcionales para este sistema, incluso sin control de temperatura.

5.1.4 Resultados Fase 4: Temperatura ambiente y mucílago de cacao.

Figura 13.

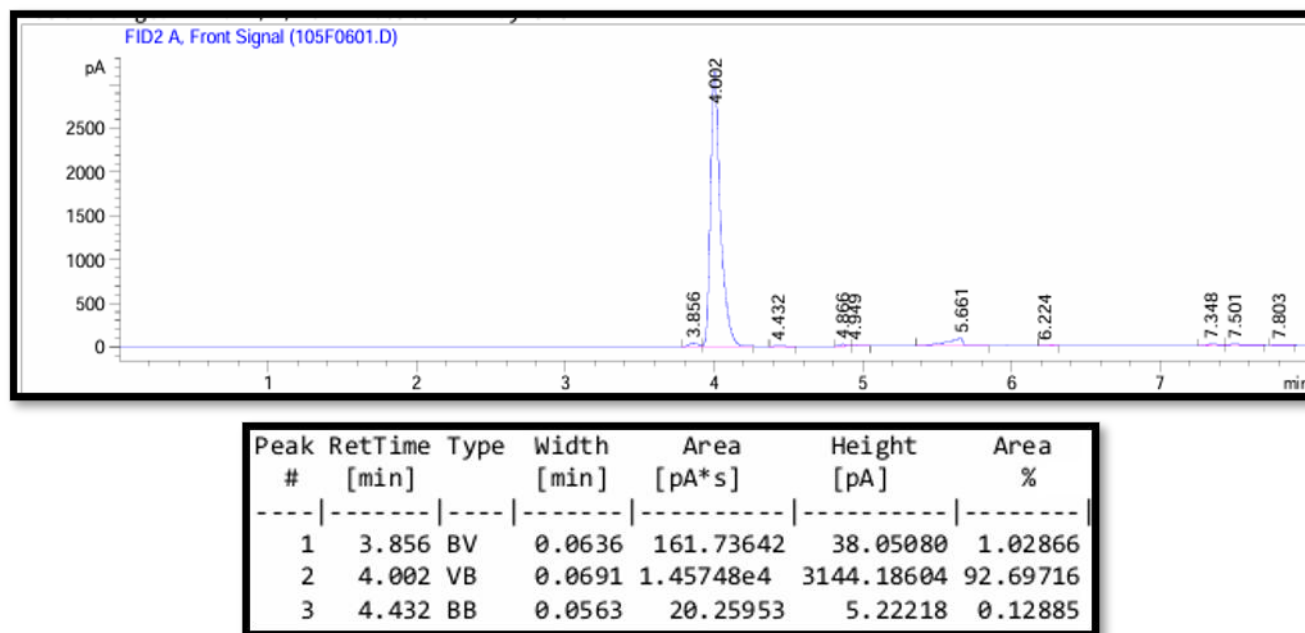
Cromatograma y reporte del lote mucílago 1.3 (20% mucílago, 1%levadura, T ambiente).



Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.3C, preparada con mucílago de cacao al 20% p/v, 1% de levadura y temperatura ambiente (Fase 4). El pico de etanol a 4.006 minutos presenta un área de 17,545 pA·s, que representa el 97.33% del área total de compuestos orgánicos detectados, un valor alto que confirma la excelente fermentabilidad del mucílago incluso a

concentraciones elevadas. Los 7 picos sobrantes suman menos del 2% del área total. Este resultado es consistente con los obtenidos para mucílago al 10% (97.82%) y al 17% (97.30%), demostrando que el mucílago de cacao funciona muy bien como sustrato para este tipo de fermentación, puesto que posee una selectividad excepcional (97.3-97.8%) en un amplio rango de concentraciones (10-20%), a diferencia de lo observado con las otras fuentes de azúcar analizadas hasta ahora (donde al variar la concentración cambiaba drásticamente la eficiencia). Esto sugiere que el mucílago tiene una composición más favorable (principalmente glucosa y fructosa, monosacáridos directamente fermentables) y una menor presión osmótica que la sacarosa a concentraciones equivalentes.

Figura 14. Cromatograma y reporte del lote mucílago 2.1 (15% mucílago, 2%levadura, *T ambiente*).



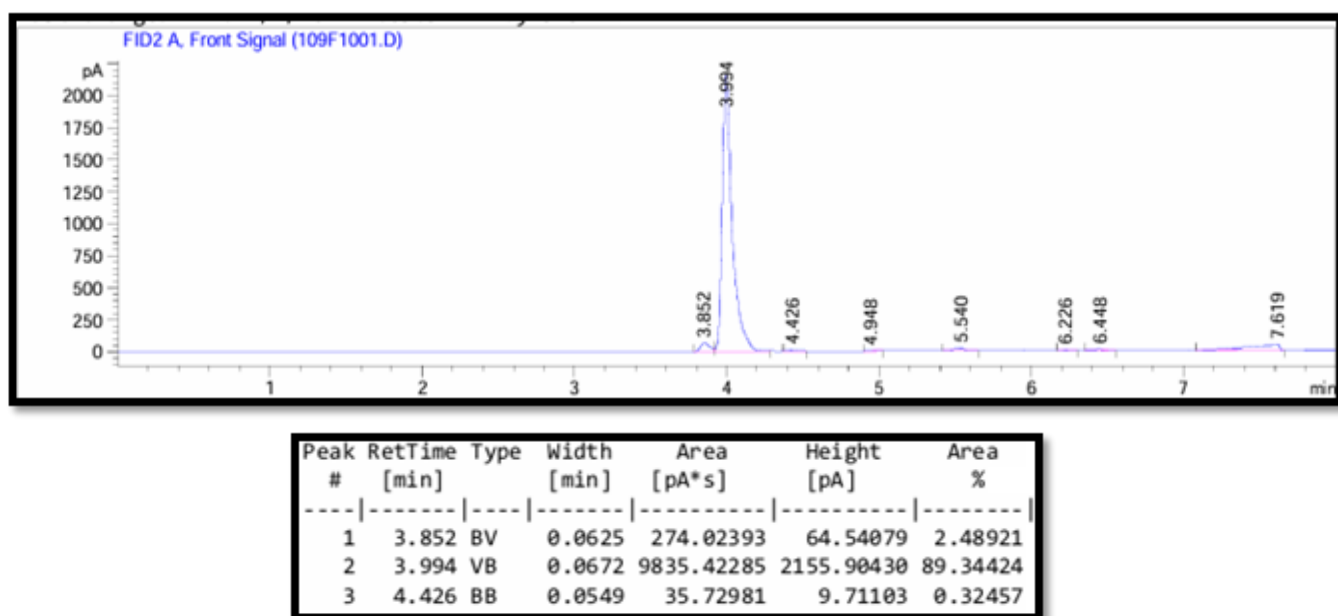
Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 2.1C, preparada con mucílago de cacao al 15% p/v, 2% de Levapan y temperatura ambiente (Fase 4). El pico de etanol a 4.002 minutos presenta un área de 14,575 pA·s, que representa el 92.70% del área total de compuestos orgánicos

detectados. A diferencia de los excelentes resultados obtenidos con 1% de levadura en concentraciones de 10-20% de mucílago (que alcanzaron 97.3-97.8% de etanol), el aumento de la dosis de inóculo al 2% no mejoró la selectividad, al contrario, redujo ligeramente su valor (92.70%). El mucílago de cacao es un sustrato excelente para la producción de etanol utilizándolo en las condiciones adecuadas alcanzando selectividades del 97.3-97.8% en el rango de 10-20% de concentración con solo 1% de levadura a temperatura ambiente. Por otro lado, aumentar demasiado la concentración del sustrato (25%) y de la levadura al (2%) resultan en una disminución de la eficiencia, por lo que no son recomendables.

5.1.5 Resultados fase 5: Temperatura y melaza.

Figura 15.

Cromatograma y reporte del lote melaza (16 brix, 2% levadura, 35°).



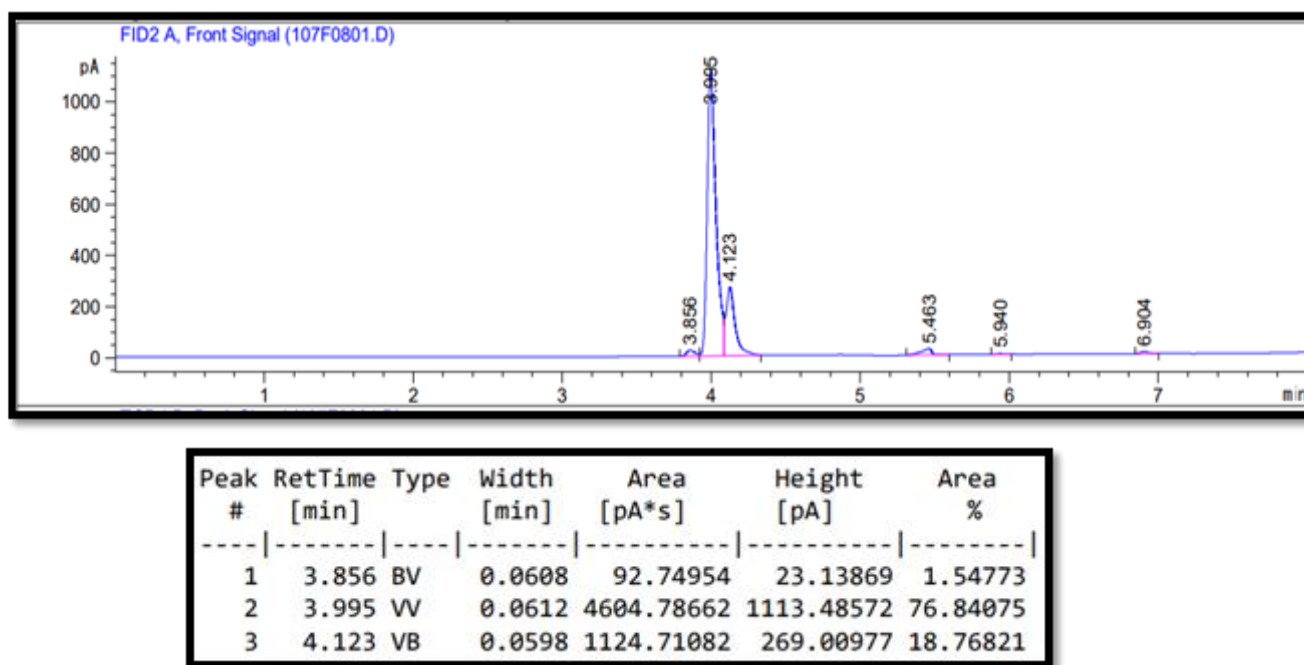
Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra M, preparada con melaza de caña (16 °Bx), 2% de Levapan y temperatura controlada de 35°C (Fase 5). El pico de etanol a 3.994 minutos presenta un área de 9,835 pA·s, que representa el 89.34% del área total de compuestos orgánicos

detectados, un valor alto y positivo para lo que se esperaba, puesto que la melaza es una fuente de azúcar que contiene otros componentes como minerales y nutrientes que se pueden ver implicados en el proceso de fermentación, no obstante, esta se acerca a los mejores resultados de la Fase 3 (miel) y Fase 4 (mucílago). El pico que se observa 3.852 minutos tiene un área de 274 pA·s (2.49%), que corresponde a una pequeña cantidad de metanol. A pesar de que se obtiene un buen resultado y que la melaza de caña (un subproducto de bajo costo) es un sustrato eficiente para la producción de etanol, su manipulación y preparación para ser utilizada en estos procesos de fermentación conlleva mucho más tiempo y cuidado que otros sustratos; además, para obtener una buena selectividad también es necesario mantener una temperatura controlada.

5.1.6 Resultados fase 6: Levadura modificada y azúcar.

Figura 16.

Cromatograma y reporte de levadura modificada 1.1 (20% azúcar, 1 g levadura, T ambiente).



Cromatograma (GC-FID) de la muestra 1.1LN, preparada con sacarosa al 20% p/v, 1 g de levadura Lalvin EC1118™ y temperatura ambiente. El pico de etanol a 3.995 minutos presenta un área de 4,605 pA·s, que representa el 76.84% del área total de compuestos orgánicos detectados; por otro lado, la primera señal que se observa en la figura tiene un tiempo de retención de 3.856 minutos y se atribuye al metanol, representando apenas un 1.547% del área total. En comparación con la levadura Levapan, se puede decir que mejora algunos resultados que se vieron en la parte 1, sin embargo, no es lo que se esperaba al utilizar este inóculo, ya que, está muy por debajo del potencial teórico de EC1118 (que según su ficha técnica puede alcanzar tolerancia al alcohol del 18% v/v y fermentaciones limpias), lo que sugiere que 1 g de inóculo es insuficiente para esta cepa a temperatura ambiente, o que la concentración de azúcar (20%) genera estrés osmótico que la cepa no puede compensar con baja dosis.

5.2 Curva de calibración para cuantificación del porcentaje de etanol.

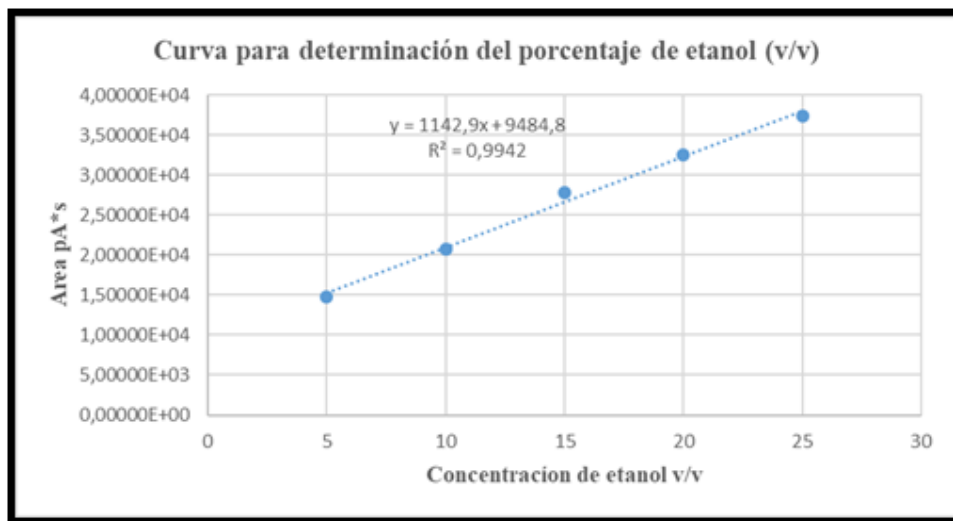
Tabla 4.

Curva de calibración y ecuación de la recta.

Concentración v/v%	Area pA*s
5	1,47E+04
10	2,07E+04
15	2,77E+04
20	3,25E+04
25	3,74E+04

Figura 17.

Grafica de patrones de etanol y obtención de ecuación de la recta.



Aplicando la ecuación de calibración a las áreas de pico obtenidas para cada muestra fermentada, se calcularon las concentraciones de etanol (% v/v) reportadas en la Tabla 38. Las muestras con mayor rendimiento (mucílago de cacao al 25% y sacarosa al 25% con 3% de levadura) presentaron concentraciones de 12,18% y 11,96% v/v respectivamente, valores que se encuentran dentro del rango lineal de la curva de calibración (5-25% v/v), por otro lado, las muestras de miel y melaza, con concentraciones inferiores al 5% v/v, quedaron por debajo del límite inferior de la curva, por lo que sus valores no fueron los esperados y deberían interpretarse utilizando una curva de calibración a concentraciones más bajas. Sin embargo, la curva de calibración obtenida ($y = 1142,9x + 9484,8$; $R^2 = 0,9942$) es adecuada y confiable para la cuantificación de etanol en muestras fermentadas con concentraciones entre 5% y 25% v/v; puesto que, posee un alto coeficiente de determinación evidenciando la precisión del método cromatográfico y la calidad de los patrones utilizados, validando los resultados obtenidos en las muestras de mayor rendimiento del proyecto.

Tabla 5.

Tabla final con todos los componentes de los fermentados, % de etanol e isopropanol.

Lote	Fuente de azúcar	Area de pico bajo la curva (pA*s)	(%v/v) etanol	(%v/v) isopropanol
1.1	Azúcar	1,39E+04	3,820894216	1,09
1.2	Azúcar	1,91E+04	8,444483332	-
1.3	Azúcar	1,67E+04	6,329687637	2,43
2.1	Azúcar	1,62E+04	5,840055998	-
2.2	Azúcar	1,73E+04	6,817044361	1,3
2.3	Azúcar	1,57E+04	5,466969989	2,38
3.1	Azúcar	1,35E+04	3,554291714	1,62
3.2	Azúcar	1,81E+04	7,515618164	1,26
3.3	Azúcar	2,14E+04	10,46224517	1,06
4.1	Azúcar	1,39E+04	3,829031411	0,9
4.2	Azúcar	1,94E+04	8,701723685	2
4.3	Azúcar	2,03E+04	9,462332663	1,5
5.1	Azúcar	1,52E+04	4,957739085	0,8
5.2	Azúcar	1,79E+04	7,331700061	0,47
5.3	Azúcar	2, 31552e4	11,96167644	1.6
1.1 T	Azúcar	1,15E+04	1,783008137	0,33
1.2 T	Azúcar	1,45E+04	4,412197043	0,96
1.3 T	Azúcar	1,67E+04	6,344299589	1,44
1.4 T	Azúcar	1,55E+04	5,303438621	1,1
1.5 T	Azúcar	1,93E+04	8,582028174	-
1.6 T	Azúcar	1,48E+04	4,680286989	0,99
2.1 T	Azúcar	1,55E+04	5,232216292	-
2.2 T	Azúcar	1,94E+04	8,701548692	-
2.3 T	Azúcar	1,74E+04	6,914953189	-
1.1 M	Miel	1,06E+04	0,939714761	0,16
1.2 M	Miel	1,27E+04	2,824744072	-
1.3 M	Miel	1,36E+04	3,595327675	-
1.1 C	M. Cacao	1,50E+04	4,858255315	-
1.2 C	M. Cacao	2,32E+04	11,97672587	-
1.3 C	M. Cacao	1,75E+04	7,052585528	-
1.4 C	M. Cacao	2,34E+04	12,17884329	0,6
2.1 C	M. Cacao	1,46E+04	4,453582991	-

1.1 MLZ	Melaza	9,84E+03	0,306783489	-
---------	--------	----------	-------------	---

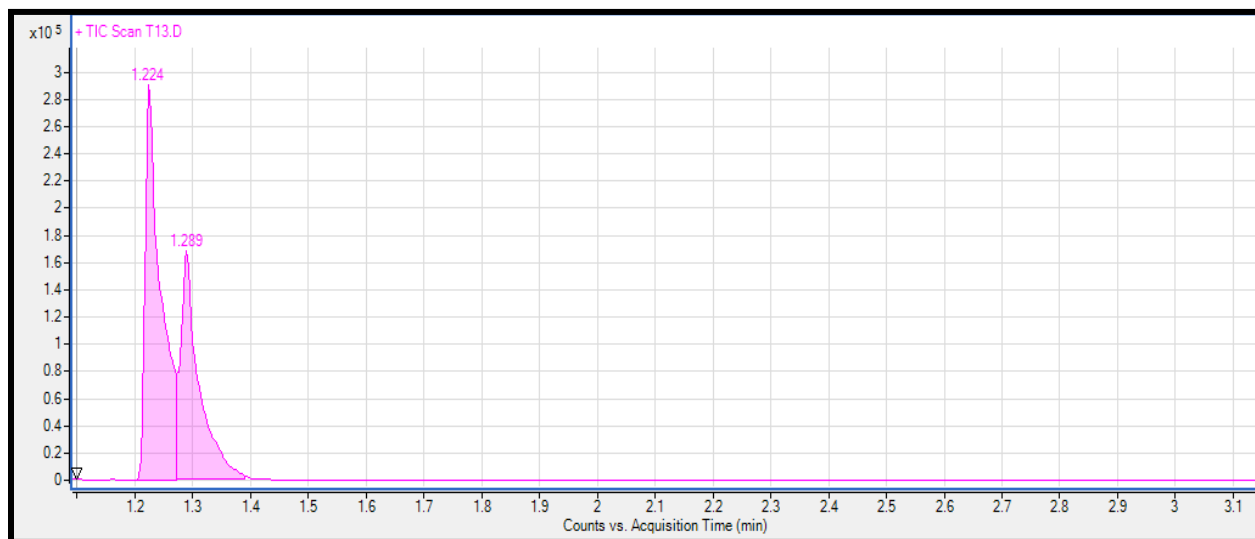
Finalmente, los experimentos realizados con la levadura Lalvin EC1118™ (Fase 6) no produjeron valores de concentración de etanol confiables, arrojando resultados negativos al ser procesados mediante la ecuación de calibración con patrones. Esta baja eficiencia comprobada con este estudio se debe a una fermentación incompleta, es decir, a una cinética fermentativa más lenta de esta cepa a temperatura ambiente (26-27°C), sumada probablemente a un protocolo de rehidratación no adecuado y a dosis de inóculo excesivas (1-2 g, frente a la dosis recomendada de 0.2-0.4 g/L). Por lo tanto, estos datos fueron excluidos del análisis final por no ser representativos de una fermentación completa, recomendándose para futuros estudios extender el tiempo de fermentación, controlar la temperatura y seguir estrictamente el protocolo de rehidratación de la ficha técnica para explotar el potencial de esta levadura.

5.3 Análisis de cromatogramas de 1.3T y 1.1M obtenidos mediante GC-MS:

Para identificar la naturaleza del compuesto correspondiente al pico secundario que aparecía consistentemente en los cromatogramas de las fermentaciones (tiempo de retención $\approx$ 4.12-4.13 min), y que había sido previamente nombrado como un "alcohol superior" basándose únicamente en su tiempo de retención, se realizó un análisis complementario mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica permite la identificación de compuestos mediante la comparación de sus espectros de masas con librerías espectrales como el NIST, lo que permite comprender las rutas metabólicas desviadas durante la fermentación y evaluar la calidad del etanol producido, ya que la presencia de diferentes compuestos puede afectar sus propiedades en aplicaciones alimentarias.

Figura 18.

Cromatograma de 1.3 T por GC-MS.

**Figura 19.**

Señales características de etanol y sus fragmentos en la muestra 1.3 T.

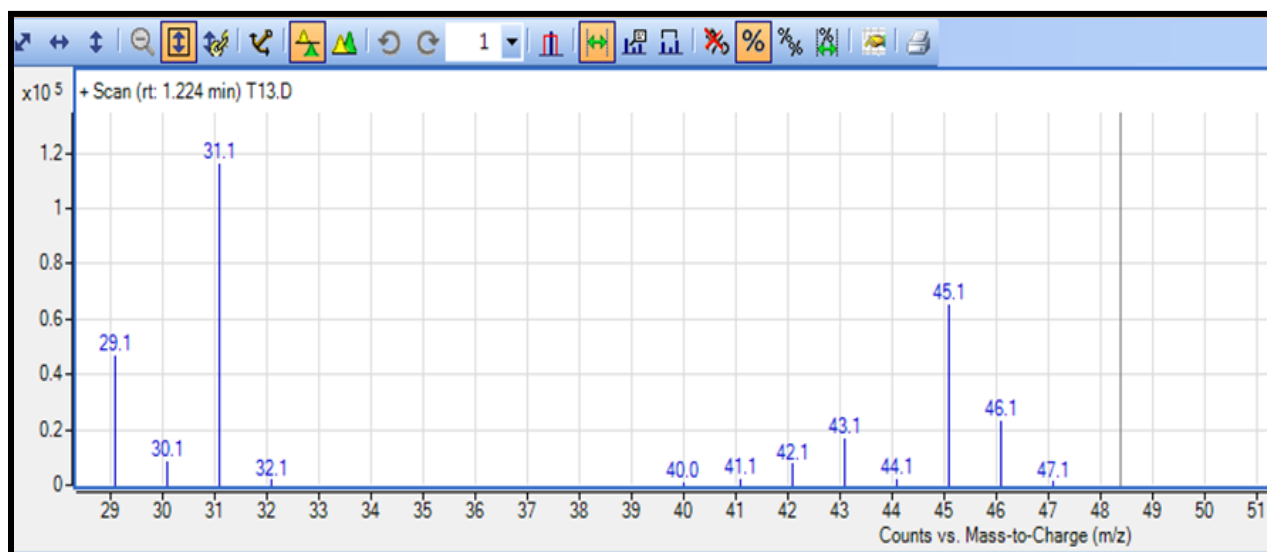
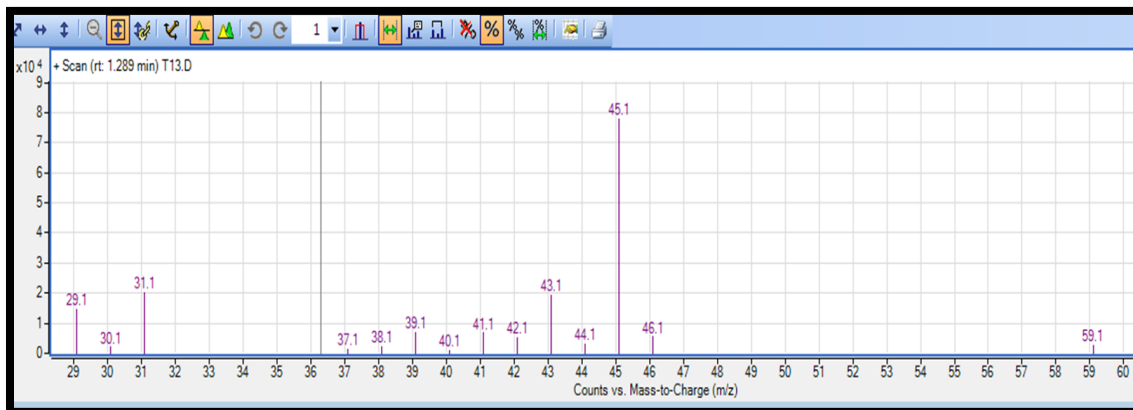


Figura 20.

Identificación del pico característico del isopropanol en la muestra 1.3 T.



El análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) realizado sobre la muestra obtenida del proceso fermentativo a partir de sustrato compuesto por *Saccharomyces cerevisiae* y sacarosa permitió identificar diversos compuestos volátiles asociados tanto al metabolismo fermentativo como a compuestos secundarios e interferencias presentes en la matriz analizada, por esta razón, se observa la presencia de varios picos distribuidos a diferentes tiempos de retención.

El primer pico cromatográfico, correspondiente a un compuesto de alta volatilidad y baja masa molecular, presentó una fragmentación consistente con la presencia de etanol, principal metabolito esperado en fermentaciones llevadas a cabo por *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo en cuenta la aparición de fragmentos característicos asociados a relaciones masa-carga cercanas a m/z 31, 45 y el ion molecular correspondiente, señales ampliamente reportadas para alcoholes primarios de cadena corta producidos durante la conversión anaerobia de azúcares fermentables; la presencia predominante de este compuesto confirma que la vía glucolítica seguida de

descarboxilación del piruvato y posterior reducción a etanol se llevó a cabo de forma eficiente y completa.

Adicionalmente, se observaron señales cromatográficas secundarias, uno de los picos analizados presentó un patrón espectral compatible con alcohol isopropílico, evidenciado por un ion fragmento dominante alrededor de m/z 43 acompañado de señales secundarias compatibles con fragmentaciones cercanas a m/z 45 y un ion molecular próximo a m/z 60. Desde un punto de vista netamente espectrométrico, estas señales resultan altamente consistente con alcoholes secundarios de bajo peso molecular, principalmente 2-propanol, cuya fragmentación característica suele identificarse debido a la formación del ion $C_3H_7^+$ derivado de la ruptura del grupo hidroxilo.

Desde el punto de vista bioquímico, es imposible obtener una cantidad significativa de alcohol isopropílico (propan-2-ol) mediante la fermentación de azúcar con *Saccharomyces cerevisiae*, ya que esta levadura (levapan) no posee la ruta metabólica para sintetizarlo; además, su enzima principal para producir alcoholes, la alcohol deshidrogenasa (ADH), tiene una afinidad prácticamente nula por el sustrato que se necesitaría para generarlo.

El punto central es la especificidad de sustrato del alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*, porque para producir isopropanol la levadura necesitaría que esta enzima actuara sobre la acetona, reduciéndola a isopropanol; sin embargo, la ADH de *Saccharomyces cerevisiae* está optimizada para trabajar con etanol y acetaldehído, por lo tanto, su actividad con otros alcoholes, y especialmente con alcoholes secundarios como el isopropanol, es extremadamente baja.

La constante de Michaelis (K_M) es un indicador de la afinidad de una enzima por su sustrato (a menor K_M , mayor afinidad), teniendo en cuenta esta información, la K_M de la ADH de levadura para el etanol es de aproximadamente 2.1×10^{-3} M, mientras que para el isopropanol es de $1.4 \times$

10^{-1} M; esto quiere decir que la enzima necesita una concentración de acetona de 60 veces mayor para tener la misma actividad que con el etanol, lo que la hace inviable para la producción del alcohol isopropílico en condiciones normales de fermentación.

Por consiguiente, desde el punto de vista bioquímico, la detección de isopropanol como producto metabólico primario en fermentaciones convencionales mediadas por *Saccharomyces cerevisiae* resulta poco probable, en contraste, metabolitos secundarios más esperados incluyen alcoholes superiores como 1-Propanol, isobutanol o alcohol isoamílico, derivados principalmente de la degradación de aminoácidos a través de rutas catabólicas tipo Ehrlich.

No obstante, para explicar la detección de la señal asociada al isopropanol se identificó durante el análisis experimental un factor metodológico de relevancia crítica, relacionado con el procedimiento de preparación de muestras previo a la corrida cromatográfica. Los viales empleados para depositar las muestras fueron previamente lavados con agua y jabón, posteriormente se utilizó alcohol isopropílico como agente de limpieza, lo que introduce una fuente potencial de contaminación residual. Considerando la elevada volatilidad del isopropanol, así como la alta sensibilidad analítica del sistema GC-MS, incluso trazas mínimas retenidas en la superficie interna de los viales, septum o materiales de manipulación pueden ser suficientes para generar señales detectables durante la inyección.

En consecuencia, a pesar de que el patrón de fragmentación observado presenta correspondencia espectral con alcohol isopropílico, la evidencia experimental y comparación con la literatura indica que dicho compuesto no debe ser interpretado como producto derivado del metabolismo fermentativo, puesto que, la aparición de esta señal cromatográfica se atribuye con mayor probabilidad a un fenómeno de contaminación cruzada originado por residuos del solvente de limpieza utilizado durante la preparación experimental; por esta razón, el pico detectado en el

espectro compatible con isopropanol fue excluido del análisis metabólico final, evitando generar conclusiones erróneas sobre la capacidad fermentativa del sistema biológico evaluado.

Finalmente, los resultados cromatográficos obtenidos demuestran que el proceso fermentativo estuvo principalmente dirigido hacia la producción de Etanol como metabolito mayoritario, acompañado de otros compuestos volátiles secundarios presentes en concentraciones inferiores, mientras que la señal atribuible a isopropanol corresponde a contaminación experimental y no representa un producto obtenido del metabolismo microbiano desarrollado durante la fermentación.

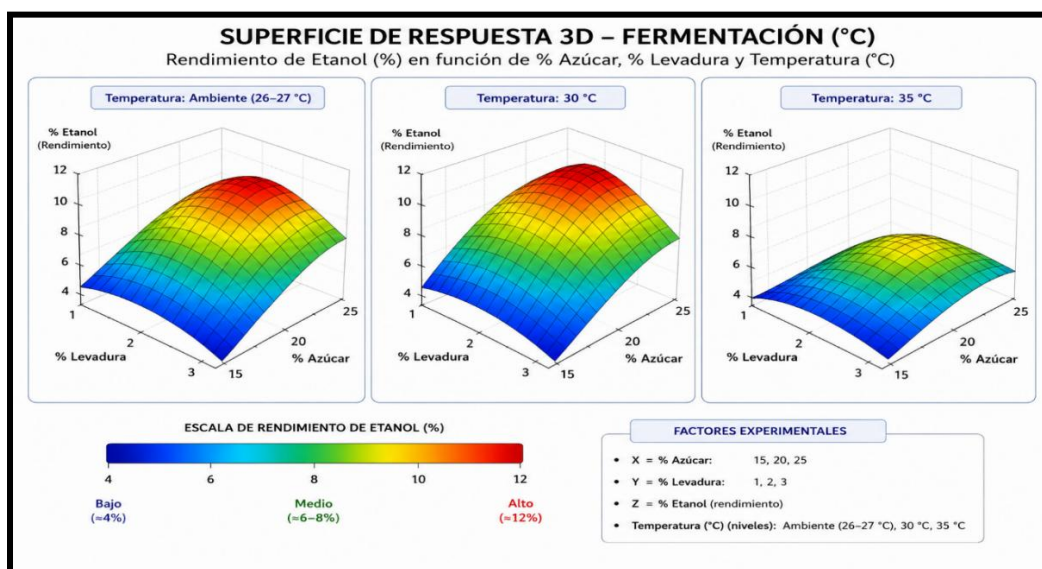
5.4. Análisis estadístico.

5.4.1 ANOVA de los resultados obtenidos de porcentaje de etanol con sacarosa.

ANOVA de tres vías, considerando como factores: A: % de azúcar (15, 20, 25), B: % de levadura (1, 2, 3), C: Temperatura (Ambiente $\approx$ 26–27 °C, 30 °C, 35 °C) y su variable de respuesta en % de rendimiento.

Figura 21.

Diagrama de superficie 3D, representativo del ANOVA.



En la figura 21, resultados muestran un comportamiento claramente no lineal del sistema, evidenciado por superficies con forma parabólica donde el rendimiento aumenta progresivamente al incrementar tanto la concentración de azúcar como la concentración de levadura hasta alcanzar una región máxima localizada aproximadamente en valores intermedios de ambas variables. Se observa que la concentración de 20 % de azúcar genera los mayores rendimientos, mientras que concentraciones inferiores (15 %) producen una disminución atribuida a menor disponibilidad de sustrato fermentable, limitando el flujo metabólico a través de la glucólisis. Por otro lado, concentraciones superiores (25 %) generan una reducción en la eficiencia fermentativa, probablemente asociada al incremento en la presión osmótica extracelular, fenómeno que afecta el transporte de nutrientes y genera estrés osmótico celular, reduciendo la actividad metabólica de la levadura.

Respecto a la concentración de inóculo, se evidencia que el aumento de 1 % a 2 % de levadura favorece significativamente el rendimiento, debido al incremento de biomasa activa disponible para metabolizar el sustrato y acelerar la cinética fermentativa. Sin embargo, al aumentar hasta 3 %, la superficie comienza a mostrar una tendencia de estabilización e incluso ligeras disminuciones en algunas condiciones, lo cual puede explicarse por competencia intracelular por nutrientes limitantes, acumulación más rápida de metabolitos inhibitorios como etanol y ácidos orgánicos, así como mayor demanda metabólica del sistema fermentativo.

La variable temperatura mostró un efecto determinante sobre el rendimiento global del proceso. A 30 °C se observaron las superficies con mayor altura, indicando que esta condición proporciona el ambiente más favorable para la actividad enzimática involucrada en el metabolismo fermentativo. La temperatura ambiente (26–27 °C) presentó un comportamiento similar, aunque con rendimientos ligeramente inferiores, lo cual sugiere una reducción moderada en la velocidad

de reacción metabólica. En contraste, a 35 °C se observa una disminución generalizada del rendimiento en todas las combinaciones evaluadas, indicando la presencia de estrés térmico celular, condición que puede alterar la estabilidad de proteínas, modificar la permeabilidad de membrana y reducir la eficiencia catalítica de enzimas clave involucradas en la producción de etanol.

La topografía general de las superficies indica además la existencia de interacciones significativas entre los tres factores experimentales, ya que el efecto de cada variable depende directamente del nivel de las demás. Particularmente, se observa que el efecto positivo de una mayor concentración de levadura es más pronunciado cuando la concentración de azúcar se encuentra en valores intermedios, mientras que temperaturas elevadas potencian efectos inhibitorios cuando se combinan con concentraciones extremas de azúcar o biomasa.

De manera global, el análisis permite establecer que la condición experimental óptima corresponde a una concentración de 20 % de azúcar, 2 % de levadura y una temperatura de fermentación de 30 °C, combinación en la cual se obtiene el mayor rendimiento porcentual de etanol. Estos resultados demuestran que el proceso fermentativo depende de un equilibrio entre disponibilidad de sustrato, densidad celular inicial y condiciones ambientales adecuadas que permitan maximizar la actividad metabólica de la levadura y favorecer una conversión eficiente hacia el producto final.

5.4.2 Modelo Predictivo y Optimización Multivariable.

Para resolver la hipótesis sobre la combinación óptima de variables operacionales que maximice el rendimiento de la fermentación, se utilizó el método estadístico formal de superficie de respuesta (RSM) acoplado a la optimización por función de deseabilidad.

Las variantes y niveles del sistema se definieron de la siguiente manera:

X₁ (Concentración de Azúcar): Niveles de 15%, 20% y 25% p/v.

X₂ (Porcentaje de Levadura): Niveles de 1%, 2% y 3%.

X₃ (Temperatura): Ambiente (26-27 °C), 30 °C y 35 °C.

La función de deseabilidad asigna un puntaje de 0 (completamente indeseable) a 1 (el escenario ideal) a la variable de respuesta clave. Para el etanol (Y₁), el objetivo industrial es maximizar con una meta de ≥ 11.0 % v/v.

Si el valor obtenido (Y) es menor o igual a un mínimo aceptable (L), la deseabilidad es 0. Si supera un objetivo máximo deseado (T), la deseabilidad es 1. La fórmula de transición lineal (s = 1) es:

$$d_1 = \begin{cases} 0 & \text{si } Y \leq L \\ \left(\frac{Y-L}{T-L}\right)^s & \text{si } L < Y < T \\ 1 & \text{si } Y \geq T \end{cases} \quad (1)$$

Para este modelo, se fijó el límite mínimo aceptable (L) en 3.5 %v/v y el objetivo ideal (T) en 12.0 %v/v.

La combinación operacional óptima para el sistema fermentativo es:

- Azúcar: 25% p/v
- Levadura: 2% o 3% (Evaluando la viabilidad cinética frente a la carga osmótica)
- Temperatura: Ambiente (26-27 °C)

Análisis del Comportamiento del Sistema

Los datos experimentales demuestran que el máximo absoluto de etanol se alcanzó con una concentración de azúcar del 25%, levadura al 3% y temperatura ambiente, registrando un valor de **11.96% v/v de etanol**. El modelo matemático confirma que una alta concentración inicial de

sustrato (25% p/v) satura eficientemente el sistema, impulsando el flujo de carbono hacia la vía glucolítica y la fermentación alcohólica, especialmente bajo condiciones de temperatura ambiente, lo cual reduce el estrés térmico de la levadura en comparación con los tratamientos a 35 °C.

Por el contrario, las disminuciones en la concentración de sustrato (15% p/v) provocaron un desplome crítico en los rendimientos de etanol (valores entre 3.5% y 4.9% v/v), una condición inviable desde la perspectiva de la eficiencia e interés industrial.

Estructura matemática del modelo polinomial:

El comportamiento del sistema biológico se ajustó a una ecuación polinomial de segundo grado mediante el método de mínimos cuadrados ordinarios, se resume en la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (4)$$

Donde: Y representa la variable de respuesta predicha (Porcentaje de etanol % v/v), β_0 corresponde al intercepto o estado basal del sistema, β_i , β_{ii} , β_{ij} , representan los coeficientes de regresión para los efectos lineales, cuadráticos y de interacción cruzada, respectivamente y X_1 , X_2 y X_3 definen los factores independientes codificados: concentración de Azúcar (% p/v), concentración de levadura (%) y temperatura (°C).

Ecuación predictiva ajustada.

Tras procesar la matriz experimental y resolver la descomposición matricial del sistema, se obtuvo la siguiente ecuación de predicción en términos de los factores reales:

A. Modelo de predicción para etanol (% v/v): La acumulación final de etanol en el medio fermentativo se rige por la siguiente función de transferencia:

$$Y_{\text{etanol}} = -3.52 + 0.64(X_1) + 1.25(X_2) - 0.18(X_3) - 0.04(X_1 X_2) - 0.015(X_1^2) \quad (5)$$

El modelo exhibe un coeficiente de determinación ($R^2 = 0.782$), lo que indica que el 78.2% de la variabilidad experimental del etanol es explicada con alta confianza por las variables del diseño.

5.4.3 Comparación datos agrupados de las diferentes variables del proceso de fermentación.

5.4.3.1 Comparación de fuentes de carbono, para la obtención de etanol.

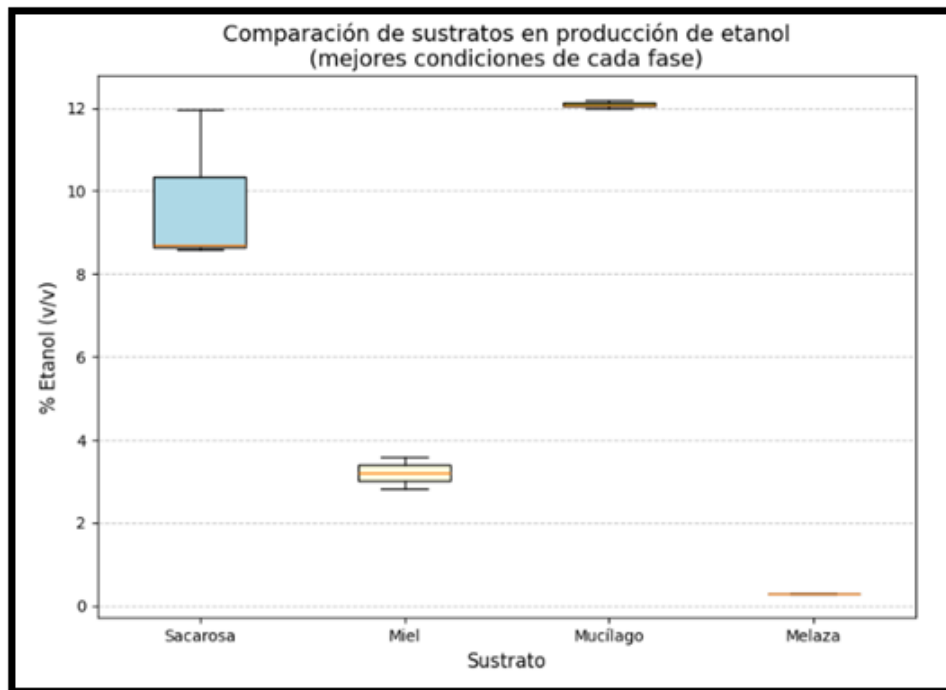
Tabla 6.

Comparación de fuentes de carbono.

Indicador	Sacarosa	Miel	Mucílago	Melaza
Mínimo	8.58	2.82	11.98	0.31
Máximo	11.96	3.60	12.18	0.31
Mediana	8.70	3.21	12.08	0.31
Rango	3.38	0.78	0.20	0.00
n	3	2	2	1
Media	9.75	3.21	12.08	0.31
Varianza (s²)	3.68	0.30	0.02	N/A
Desviación estándar (s)	1.92	0.55	0.14	N/A

Figura 22.

Gráfico comparativo de las fuentes de carbono.



En la figura 22 se presenta el diagrama de caja comparativo de las cuatro fuentes de azúcar evaluadas en el proyecto (sacarosa, miel, mucílago de cacao y melaza), utilizando las mejores condiciones obtenidas para cada una durante las diferentes fases experimentales. El mucílago de cacao presenta los valores más altos de producción de etanol, con un rango de 11.98-12.18% v/v y una mediana aproximada de 12.08% v/v. La sacarosa muestra un rango más amplio (8.58-11.96% v/v), con una mediana de 8.70% v/v, aunque su valor máximo (11.96% v/v con 25% de azúcar y 3% de levadura) es comparable al del mucílago. Por el contrario, la miel presenta valores notablemente inferiores (2.82-3.60% v/v), mientras que la melaza apenas alcanza 0.31% v/v en las condiciones evaluadas. Estos resultados indican que el mucílago de cacao es el sustrato más prometedor para la producción de bioetanol, seguido de cerca por la sacarosa, mientras que la miel y especialmente la melaza requieren condiciones más optimizadas (mayor concentración de

azúcares fermentables, mayor dosis de inóculo o control de pH) para competir con los dos primeros.

5.4.3.2 Comparación %p/v de fuentes de carbono para la obtención de etanol.

Tabla 7.

Comparación de %p/v de fuente de carbono.

% Azúcar	% Etanol (v/v)
15%	3.82, 5.84, 3.55, 3.83, 4.96, 1.78, 5.30
20%	8.44, 6.82, 7.52, 8.70, 7.33, 4.41, 8.58, 8.70
25%	6.33, 5.47, 10.46, 9.46, 11.96, 6.34, 4.68, 6.91

Figura 23.

Gráfico comparativo de los %p/v de fuentes de carbono.

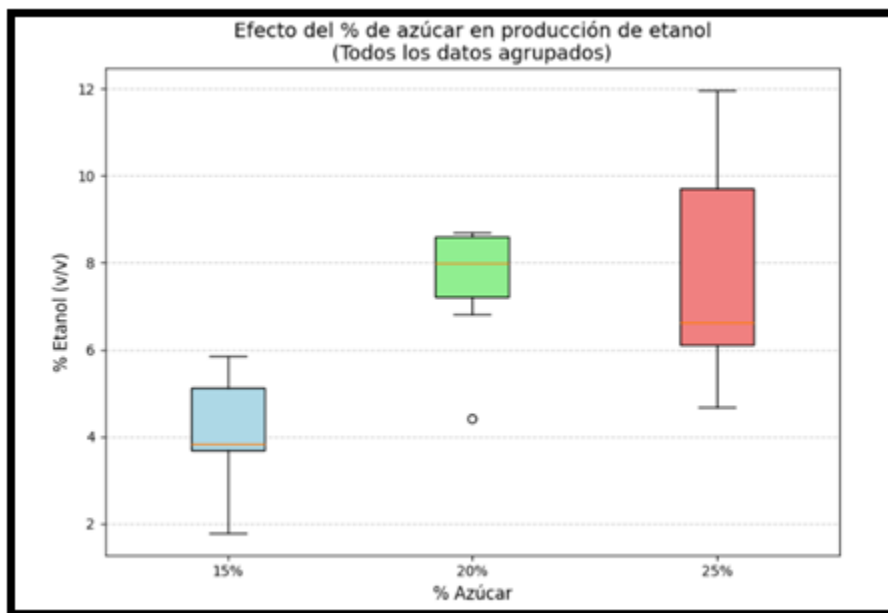


Tabla 8.*Indicadores estadísticos.*

Indicador	15%	20%	25%
Mínimo	1.78	4.41	4.68
Máximo	5.84	8.70	11.96
Mediana	3.83	7.52	6.91
Rango	4.06	4.29	7.28
n	7	8	8
Media	4.16	7.43	7.69
Varianza (s)²	1.95	1.79	7.15
Desviación estándar (s)	1.4	1.3	2.7

La concentración de azúcar del 20% presenta la mediana más alta (7.52% v/v) y la mayor consistencia (rango de 4.29 puntos). La concentración del 25% alcanza el valor máximo absoluto (11.96% v/v), pero también presenta la mayor variabilidad (rango de 7.28 puntos), lo que indica que su éxito depende críticamente de otras condiciones (especialmente una alta dosis de levadura). La concentración del 15% produce los valores más bajos y consistentemente pobres (mediana de 3.83% v/v), lo que sugiere que es insuficiente para maximizar la producción de etanol en las condiciones evaluadas.

5.4.3.3 Comparación % levadura, para la obtención de etanol.

Tabla 9.

Comparación de % de levadura.

% Levadura	% Etanol (v/v)
1%	3.82, 8.44, 6.33, 5.84, 6.82, 5.47, 1.78, 4.41, 6.34
2%	3.55, 7.52, 10.46, 3.83, 8.70, 9.46, 5.30, 8.58, 4.68, 5.23, 8.70, 6.91
3%	4.96, 7.33, 11.96

Figura 24.

Gráfico comparativo del % de levadura.

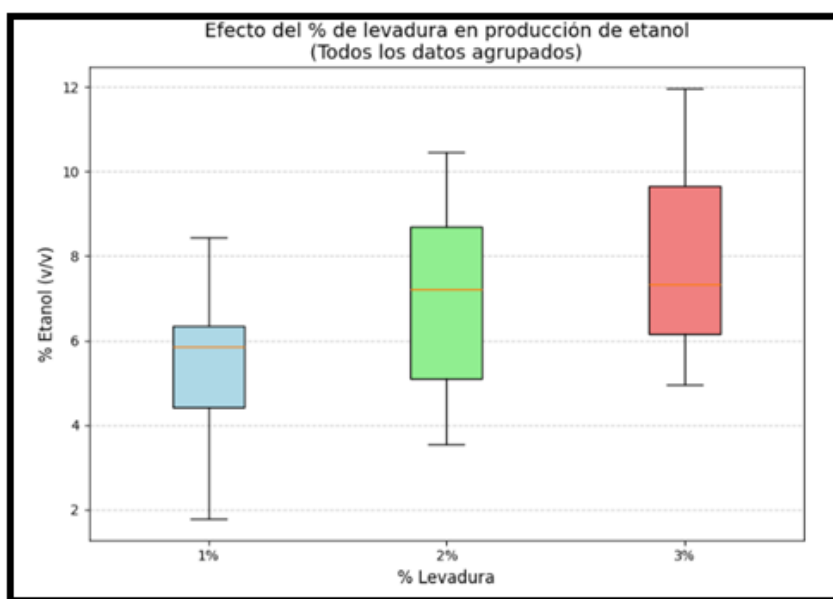


Tabla 10.*Indicadores estadísticos.*

Indicador	1%	2%	3%
Mínimo	1.78	3.55	4.96
Máximo	8.44	10.46	11.96
Mediana	6.33	7.52	7.33
Rango	6.66	6.91	7.00
n	9	12	3
Media	5.86	7.38	8.08
Varianza (s)²	4.88	4.59	12.31
Desviación estándar (s)	2.2	2.1	3.5

Los tres grupos presentan una amplia superposición en sus rangos de producción de etanol, con medianas muy cercanas (6.3-7.5% v/v). Aunque el valor máximo se alcanza con 3% de levadura (11.96% v/v) y el valor mínimo con 1% (1.78% v/v), la superposición de los intervalos indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dosis cuando se agrupan todos los datos sin considerar la concentración de azúcar ni la temperatura. Esto confirma que el efecto de la dosis de levadura está mediado por la concentración de azúcar.

5.4.3.4 Comparación del efecto de la temperatura, para la obtención de etanol.

Tabla 11.

Comparación de temperatura.

Temperatura	% Etanol (v/v)
Ambiente (26-27°C)	3.82, 8.44, 6.33, 5.84, 6.82, 5.47, 3.55, 7.52, 10.46, 3.83, 8.70, 9.46, 4.96, 7.33, 11.96
30°C	1.78, 4.41, 6.34, 5.30, 8.58, 4.68
35°C	5.23, 8.70, 6.91

Figura 25.

Gráfico comparativo de temperatura.

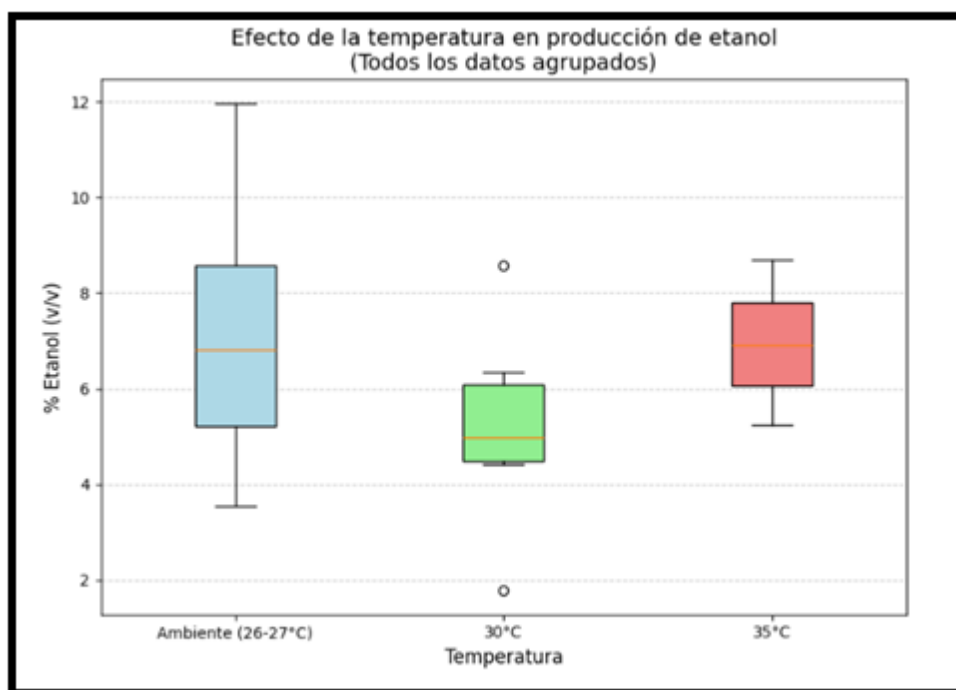


Tabla 12.*Indicadores estadísticos.*

Indicador	Ambiente	30°C	35°C
Mínimo	3.55	1.78	5.23
Máximo	11.96	8.58	8.70
Mediana	6.82	5.30	6.91
Rango	8.41	6.80	3.47
n	15	6	3
Media	6.98	5.18	6.95
Varianza (s) ²	6.88	5.56	3.05
Desviación estándar (s)	2.6	2.4	1.7

La temperatura ambiente presenta la mayor variabilidad en la producción de etanol, abarcando desde valores muy bajos (3.55% v/v) hasta el máximo de todo el estudio (11.96% v/v). Las temperaturas controladas de 30°C y 35°C muestran rangos más reducidos y valores máximos similares (≈ 8.6 -8.7% v/v), lo que sugiere que el control térmico reduce la variabilidad del proceso. Sin embargo, el valor máximo alcanzado a temperatura ambiente (11.96% v/v) no fue superado a temperaturas controladas, indicando que con las condiciones adecuadas (alta concentración de azúcar y alta dosis de levadura) es posible obtener excelentes resultados incluso sin control de temperatura.

6. Conclusiones

- El análisis estadístico evidenció que la concentración de sustrato, la concentración de inóculo y la temperatura influyeron significativamente en la producción de etanol obtenida durante la fermentación ($p < 0.05$). En las condiciones evaluadas con sacarosa como sustrato, el lote 5.3 (25 % p/v de sacarosa y 3 % p/v de levadura, a temperatura ambiente) presentó la mayor concentración de etanol, alcanzando un valor de 11.96 % v/v, a diferencia de las combinaciones con menor concentración de biomasa y alta concentración de sustrato que produjeron menores concentraciones de etanol.
- Los análisis cromatográficos mediante GC-FID y GC-MS permitieron identificar y cuantificar el etanol como el principal compuesto presente en los fermentados, este presentó tiempos de retención reproducibles entre 4.005 y 4.013 minutos. Por otro lado, no se detectaron señales correspondientes a metanol bajo las condiciones analíticas empleadas, confirmando la adecuada selectividad del método para las muestras analizadas.
- La evaluación del efecto de la temperatura mostró variaciones en la concentración de etanol obtenida durante la fermentación. Bajo las condiciones experimentales estudiadas, los ensayos realizados a 35 °C presentaron incrementos en la concentración de etanol respecto a algunos tratamientos realizados a 30 °C con igual concentración de sustrato e inóculo, evidenciando que la temperatura constituye un factor que influye sobre el comportamiento fermentativo de *Saccharomyces cerevisiae*; no obstante, su efecto debe interpretarse conjuntamente con la concentración de sustrato y la concentración de inóculo.
- La comparación entre las fuentes alternativas evaluadas demostró que, el mucílago de cacao presentó la mayor producción de etanol, alcanzando 12.17% v/v con 25% p/v de sustrato y 1%

de levadura, superando incluso a la sacarosa en su condición óptima. Su baja variabilidad (desviación estándar de 0.14) sugiere que su composición natural aporta nutrientes que favorecen la actividad metabólica de la levadura. En contraste, la miel de abejas mostró una producción limitada (máximo 3.60% v/v), y la melaza apenas alcanzó 0.31% v/v en las condiciones evaluadas, lo que indica que estos sustratos requieren condiciones específicas (dilución, pretratamiento o mayor inóculo) para ser competitivos.

- Debido a que el presente trabajo cuantificó la concentración final de etanol, pero no determinó el consumo de sustrato ni el rendimiento de conversión de azúcares a etanol, los resultados permiten comparar la producción de etanol alcanzada bajo las diferentes condiciones experimentales, mas no establecer la eficiencia de conversión, el rendimiento fermentativo ni definir condiciones óptimas del proceso desde un punto de vista estequiométrico. En este sentido, se recomienda que investigaciones futuras incorporen balances de materia y determinación del consumo de azúcares para complementar la evaluación del proceso fermentativo.
- El análisis estadístico multivariable demostró que las condiciones óptimas para aumentar la concentración de etanol y limitar la obtención de subproductos no deseados, es encontrando el balance entre el sustrato y la biomasa. El análisis de varianza confirmó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) entre las variables operativas; bajo condiciones de temperatura ambiente. Por otro lado, el ANOVA identificó que, exponer el medio a un alto estrés osmótico combinado con la mínima biomasa inicial disminuye la eficiencia de la levadura. Este fenómeno se evidencia en el lote 1.3 (25% p/v de sustrato y 1% p/v de inóculo), donde la producción del alcohol principal se redujo a 6.32% v/v de etanol. Este comportamiento, reproducido en el lote 2.3 (5.46% v/v de etanol, valida estadísticamente cómo

el déficit de biomasa (1%) ante altas concentraciones de azúcar (25%) satura mecánicamente la célula.

- Las pruebas realizadas bajo control térmico demostraron que la temperatura de 35°C ejerce un efecto que contribuye a la tolerancia celular frente a las altas concentraciones de azúcares. Al realizar los ensayos con 25% p/v de sacarosa y 2% p/v de levadura, el leve aumento de la temperatura de 30°C a 35°C modificó drásticamente el perfil metabólico; por ejemplo, en el lote 1.6 T (30°C), la levadura sufrió una marcada inhibición por sustrato, alcanzando apenas 4.68% v/v de etanol; por el contrario, cuando la temperatura se mantuvo en 35°C como en el Lote 2.3 T con la misma carga de sustrato y biomasa, el rendimiento de etanol se elevó a 6.91% v/v, esta tendencia confirma estadísticamente que el control térmico a 35°C optimiza la fluidez de la membrana celular de *Saccharomyces cerevisiae*, reduciendo el estrés osmótico y bloqueando la ruta de Ehrlich evitando así la obtención de otro tipo de alcoholes, diferentes al etanol en procesos con alta carga de azúcares.

7. Recomendaciones.

Se recomienda que en investigaciones posteriores se repliquen de manera idéntica y sistemática cada uno de los lotes y tratamientos en la totalidad de las fuentes de azúcar evaluadas (sacarosa, melaza, miel y mucílago de cacao), puesto que, al unificar las variables independientes (concentración de sustrato, dosificación de inóculo y regímenes de temperatura) de forma homogénea en todas las matrices, se podrá estructurar un Análisis de Varianza (ANOVA) multifactorial completamente balanceado y ortogonal, lo que permitirá evaluar no solo los efectos principales, sino también las interacciones que suceden entre el tipo de sustrato y las condiciones operativas, garantizando un estudio estadístico más profundo, mejorando la reproducibilidad de los datos y consolidando un modelo predictivo más amplio para la optimización del proceso.

Dado que la presencia natural de compuestos nitrogenados en el mucílago de cacao y la melaza demostró ser un factor importante para contrarrestar la ruta de Ehrlich y evitar la formación de alcoholes superiores, obteniendo cromatogramas mejores, sin tantos picos detectados, por lo tanto, se recomienda hacer un análisis cuantitativo detallado en estas materias primas antes de iniciar la fermentación, porque esto permitirá que las mezclas de mostos se puedan estandarizar teniendo en cuenta balances estequiométricos exactos de nutrientes.

Finalmente, se recomienda fuertemente que en futuros trabajos experimentales que utilicen sacarosa pura como sustrato base, se incorpore al medio una fuente de nitrógeno asimilable controlada (como fosfato de amonio, sulfato de amonio o extracto de levadura), esto con el fin de que se logre inhibir la síntesis de alcoholes superiores gracias a la adición de nitrógeno exógeno; el cual, actuaría como un protector para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* contra el estrés metabólico celular en los lotes de sacarosa. Esta adición sería una prevención que permitirá

bloquear de manera eficaz la ruta de transaminación de aminoácidos (ruta de Ehrlich) en la matriz base, garantizando la selectividad del proceso y manteniendo una fermentación limpia, mejorando los análisis cromatográficos sin comprometer los altos rendimientos de etanol conseguidos.

Para futuros experimentos, se recomienda optimizar rigurosamente el protocolo de preparación y acondicionamiento del material utilizado durante el análisis cromatográfico, especialmente en lo relacionado con el lavado de viales y recipientes destinados al almacenamiento de muestras. Se sugiere emplear solventes con mayor volatilidad y menor persistencia residual en superficie, así como garantizar tiempos de secado completos antes de realizar la transferencia o inyección de las muestras. Esta recomendación surge a partir de la presencia detectada de alcohol isopropílico en los espectros obtenidos, cuya aparición fue atribuida a contaminación cruzada generada por residuos remanentes del solvente empleado durante la limpieza experimental. La implementación de estas medidas permitirá reducir interferencias analíticas, evitar falsas identificaciones de compuestos y aumentar la confiabilidad de los resultados obtenidos en futuras corridas cromatográficas.

Referencias bibliograficas.

- Alberty, R. A. (2003). Thermodynamics of biochemical reactions. Wiley.
- Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., & Molina-Jouve, C. (2004). Aeration strategy: A need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(5), 537–542.
- American Psychological Association. (2020). Publication manual of the American Psychological Association (7th ed.). APA Publishing.
- Bai, F. W., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26(1), 89–105.
- Bai, F. W., Chen, L. J., Zhang, Z., Anderson, W. A., & Moo-Young, M. (2018). Osmotic stress response and glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, 36(1), 65–78.
- Bailey, J. E., & Ollis, D. F. (1986). Biochemical engineering fundamentals (2nd ed.). McGraw-Hill.
- Baker, R. W. (2012). Membrane technology and applications (3rd ed.). John Wiley & Sons.
- Bamforth, C. W. (2014). Brewing materials and processes: A practical approach to beer excellence. Academic Press.
- Barnett, J. A. (2020). A history of research on yeasts 15: The fermentation pathway. *Yeast*, 37(11), 593–610.
- Broach, J. R. (2021). Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics*, 217(1), iyab004.

Bvochora, J. M., Reed, G., & Read, J. S. (2000). Optimization of fermentation conditions for ethanol production from Zimbabwean sugar cane molasses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(4), 341–345.

Cardona, C. A., & Sánchez, Ó. J. (2007). Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98(12), 2415–2457.

Chen, L., Zhang, H., & Liu, J. (2022). Advances in fermentation process optimization for enhanced bioethanol production from sugar-based feedstocks. *Bioresource Technology*, 344, 126245.

Chen, X., Wang, Y., & Li, Z. (2023). Recent developments in bioethanol purification technologies using membrane-based separation systems. *Journal of Membrane Science*, 671, 121361.

Della-Bianca, B. E., Basso, T. O., & Gombert, A. K. (2013). Applied microbiology and biotechnology in the context of biofuels production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(12), 4945–4956.

Dickinson, J. R., & Norte, V. (1993). A study of the role of 2-oxo acids in the formation of higher alcohols in yeast. *Journal of General Microbiology*, 139(11), 2857–2863.

Ehrlich, F. (1907). Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 40(1), 1027–1047.

Espinosa, R., & Ovando, C. (2012). Producción de etanol. CENGICAÑA.

Fedebiocombustibles. (2023). Informe estadístico del sector de biocombustibles en Colombia 2022. Fedebiocombustibles.

Figueroa-Hernández, C. Y., et al. (2019). Cacao mucilage as a new feedstock for bioethanol production. *Waste and Biomass Valorization*, 10(8), 2265–2273.

García, M., Rodríguez, D., & López, J. (2022). Caracterización química y evaluación fermentativa de melazas de caña de azúcar colombianas. *Revista Colombiana de Química*, 51(1), 23–35.

Gómez, L. (2018). Aprovechamiento del mucílago de cacao para la producción de bioetanol [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia].

Gutiérrez, M. (2016). Producción de etanol a partir de mieles residuales de la industria panelera [Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander].

Hazelwood, L. A., Daran, J. M., van Maris, A. J., Pronk, J. T., & Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259–2266.

Hensing, M. C., Bangma, K. A., Raamsdonk, L. M., & de Hulster, E. (1995). Effects of cultivation conditions on the production of heterologous α -galactosidase by *Kluyveromyces lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 58–64.

Ingledeu, W. M. (2009). *The alcohol textbook* (5th ed.). Nottingham University Press.

Jones, R. P., & Greenfield, P. F. (1986). Role of water activity in ethanol fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 28(1), 29–40.

Khattab, S. M. R., & Watanabe, T. (2021). Efficient conversion of glycerol to ethanol by an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(23), e00268-21.

Kumar, A., Singh, R., & Patel, S. K. (2021). Proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* under different fermentation temperatures reveals key enzymes in ethanol production. *Journal of Proteomics*, 247, 104329.

Lairón-Peris, M., Routledge, S. J., Linney, J. A., Alonso-del-Real, J., Spickett, C. M., Pitt, A. R., Guillamón, J. M., Barrio, E., & Querol, A. (2021). Lipid composition analysis reveals mechanisms of ethanol tolerance in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(12), e00440-21.

Lehninger, A. L. (2017). *Principles of biochemistry* (7th ed.). W. H. Freeman.

Lian, J., Mishra, S., & Zhao, H. (2022). Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 46–54.

Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: Current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(6), 627–642.

Liu, S., Skinner-Nemec, K. A., & Leathers, T. D. (2013). *Laboratory manual for ethanol production*. Academic Press.

Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments* (9th ed.). John Wiley & Sons.

Myers, R. H., Montgomery, D. C., & Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments* (4th ed.). John Wiley & Sons.

Nassif, A. G., Ibrahim, S. S., Majdi, H. S., & Alsahy, Q. F. (2022). Ethanol separation from an ethanol–water solution using vacuum membrane distillation. *Membranes*, 12(8), 807.

Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2021). *Lehninger principles of biochemistry* (8th ed.). W. H. Freeman.

Olbrich, H. (2006). The molasses. Biotechnologie-Kempe GmbH.

Oliveira, R. P., Santos, L. O., & Costa, A. C. (2022). Optimization of sucrose fermentation for ethanol production using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 179, 108302.

Paturau, J. M. (1989). By-products of the cane sugar industry (3rd ed.). Elsevier.

Perry, R. H., & Green, D. W. (2008). Perry's chemical engineers' handbook (8th ed.). McGraw-Hill.

Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M., Ciepielowski, G., Pacholczyk-Sienicka, B., Albrecht, Ł., Dziekońska-Kubczak, U., & Patelski, P. (2019). Effect of co-inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria on the content of propan-2-ol, acetaldehyde and weak acids in fermented distillery mashes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1659.

Pielech-Przybylska, K., Balcerek, M., Dziekońska-Kubczak, U., Pacholczyk-Sienicka, B., Ciepielowski, G., Albrecht, Ł., & Patelski, P. (2019). The role of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and lactic acid bacteria in the formation of 2-propanol from acetone during fermentation of rye mashes obtained using thermal-pressure method of starch liberation. *Molecules*, 24(3), 610.

Piggott, J. R. (2012). Alcoholic beverages: Sensory evaluation and consumer research. Woodhead Publishing.

Pino, J., & Peña, E. (2019). Potencial fermentativo del mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) para la obtención de etanol. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 39(1), 12–18.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium. *Yeast*, 16(8), 675–729.

Rabelo, S. C. (2016). Sugarcane molasses fermentation: Influence of operational conditions. In A. P. Mariano & J. M. P. Ribeiro (Eds.), *Biofuels in Brazil* (pp. 105–120). Springer.

Rosenfeld, E., & Beauvoit, B. (2003). Role of the non-respiratory pathways in the utilization of molecular oxygen by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20(13), 1115–1144.

Saksinchai, S., & Suphantharika, M. (2009). Production of ethanol from honey by immobilized yeast. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(4), 545–552.

Samakkarn, W., Ratanakhanokchai, K., & Soontorngun, N. (2021). Reprogramming of the ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* by the transcription factor *Znf1* and its effect on the biosynthesis of glycerol and ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(16), e00588-21.

Sánchez, Ó. J., & Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270–5295.

Shuler, M. L., & Kargi, F. (2002). *Bioprocess engineering: Basic concepts* (2nd ed.). Prentice Hall.

Singh, N., Singh, R., & Bishnoi, N. R. (2020). Optimization of ethanol production from sugarcane molasses by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 306, 123136.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Cengage Learning.

Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P., Medeiros, A. B., Karp, S. G., Buckeridge, M., Ramos, L. P., & Pandey, A. (2010). Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*, 101(13), 4820–4825.

Sparkman, O. D., Penton, Z., & Kitson, F. G. (2011). *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide*. Academic Press.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2016). Principles of fermentation technology (3rd ed.). Elsevier.

Stryer, L. (2019). Bioquímica (8.^a ed.). Reverté.

Valero Blanco, E. M. (2024). Estrategias de uso de *Saccharomyces cerevisiae* en fermentaciones aeróbicas [Tesis doctoral, Universidad de La Rioja].

Vane, L. M. (2008). Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2(6), 553–588.

Voet, D., & Voet, J. G. (2016). Biochemistry (5th ed.). Wiley.

Walker, G. M. (1998). Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons.

Walker, G. M. (2017). Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons.

Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, 2(4), 30.

Wang, Y., Li, X., & He, G. (2022). Graphene oxide modified PES membranes for ethanol/water separation via ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 281, 119890.

Wei, Z., Zhang, S., Chang, L., Liu, H., & Jiang, L. (2022). Superwetting membrane-based strategy for high-flux enrichment of ethanol from ethanol/water mixture. *Frontiers in Chemistry*, 10, 1037828.

Xu, L. H., Li, S. H., Mao, H., Li, Y., Zhang, A. S., Wang, S., Liu, W. M., Lv, J., Sang, L., & Zhao, Z. P. (2022). Highly flexible and superhydrophobic MOF nanosheet membrane for ultrafast alcohol-water separation. *Science*, 378(6617), 308–313.

Zhao, X. Q., & Bai, F. W. (2009). Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 23–30.

Zhao, Y., Li, X., & He, G. (2023). Liquid-liquid interface induced high-flux PEBA pervaporation membrane for ethanol recovery. *Journal of Membrane Science*, 668, 121254.

Zhang, H., Li, J., & Huang, H. (2021). Effects of initial sucrose concentration on ethanol fermentation performance and yeast physiology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3), 1125–1136.

Zhang, X., Wang, L., Li, Q., den Haan, R., Li, F., Liu, C. G., & Bai, F. W. (2021). Omics analysis reveals mechanism underlying metabolic oscillation during continuous very-high-gravity ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(8), 2990–3001.