

El presente proyecto de grado ha sido desarrollado siguiendo una metodología experimental rigurosa que ha generado una cantidad considerable de datos analíticos, cromatogramas y registros operativos. Si bien la información presentada en el cuerpo principal de esta tesis corresponde a los resultados más relevantes y significativos para la demostración de los objetivos planteados, se ha considerado pertinente compilar en un documento de anexos todo el material complementario que respalda los hallazgos y permite una verificación exhaustiva de los procedimientos realizados.

Los anexos incluidos en el documento complementario contienen información detallada que no fue incorporada en el texto principal para no afectar la fluidez de la lectura y la claridad de los argumentos centrales, pero que resulta valiosa para aquellos lectores interesados en profundizar en los aspectos técnicos específicos o para quienes requieran replicar los experimentos realizados. Este material adicional constituye un registro completo de las actividades experimentales realizadas durante la investigación.

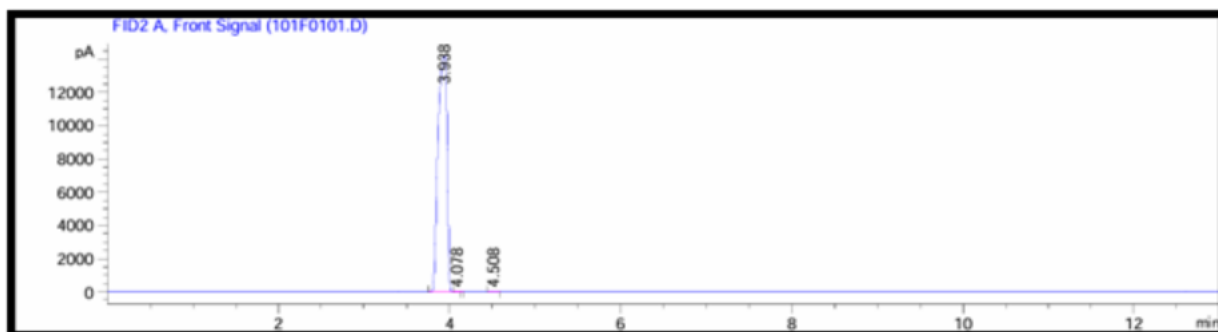
Entre los documentos complementarios se incluyen los cromatogramas obtenidos en cada una de las corridas cromatográficas realizadas mediante cromatografía de gases (GC-FID, GC-MS), tanto para la cuantificación de etanol como para la identificación y cuantificación de congéneres. Estos registros gráficos evidencian la evolución del proceso fermentativo a lo largo del tiempo, la presencia de compuestos mayoritarios y minoritarios, y los cambios en el perfil de metabolitos en función de las diferentes condiciones experimentales evaluadas.

Es importante destacar que, aunque los anexos contienen información extensa y detallada, la interpretación y discusión de los datos relevantes se ha realizado en los capítulos correspondientes del trabajo principal. Los anexos están organizados de manera coherente, numerados consecutivamente y referenciados en el texto principal para facilitar su consulta y

permitir a los lectores acceder fácilmente a la información complementaria cuando lo consideren necesario. Esta estructuración permite que el cuerpo principal de la tesis mantenga un flujo narrativo claro y enfocado, mientras que los anexos proporcionan el soporte documental completo que respalda las conclusiones presentadas.

Apéndice 1.

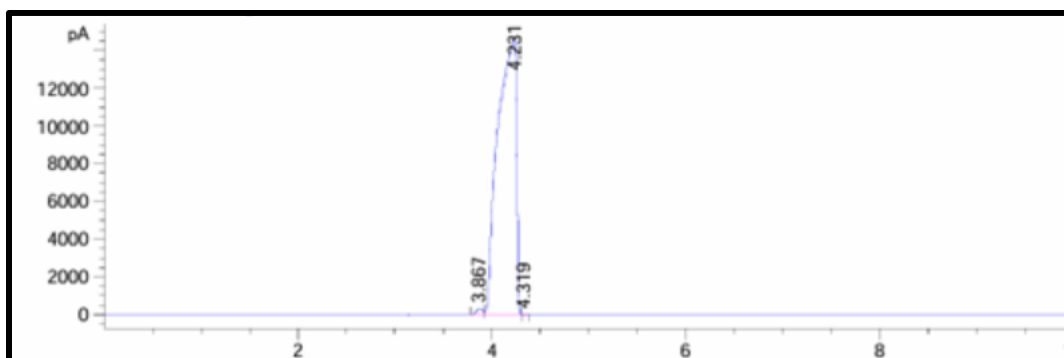
Cromatograma y reporte del estándar de metanol.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.938	BB S	0.1261	1.04791e5	1.42057e4	99.97453
2	4.078	BB X	0.0375	5.81517	2.46634	0.00555
3	4.508	BB	0.0481	20.88066	6.57431	0.01992

Apéndice 2.

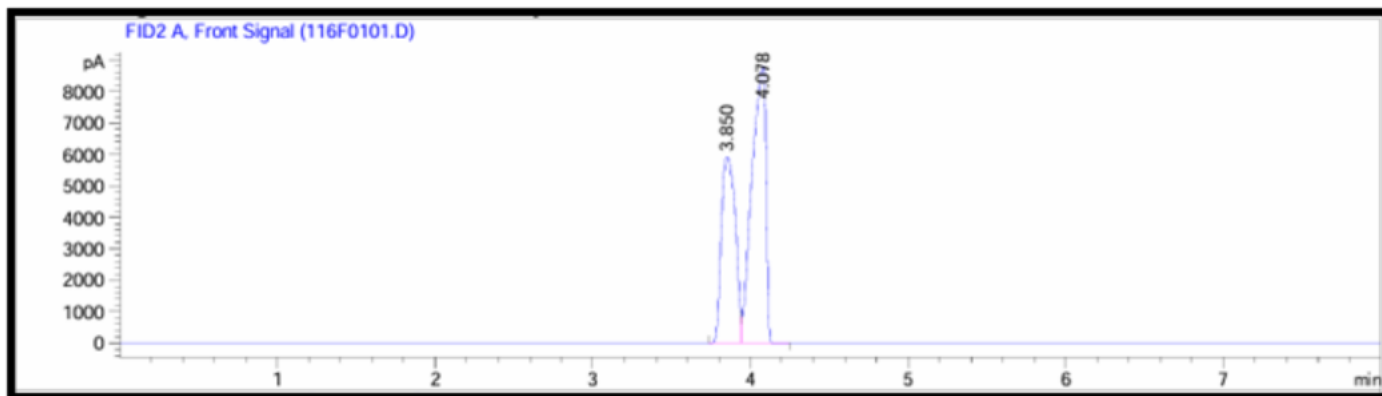
Cromatograma y reporte del estándar de etanol.



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.867	BV	0.0735	1461.39404	307.00769	0.74126
2	4.231	VV	0.1666	1.95677e5	1.46738e4	99.25201
3	4.319	VB	0.0299	13.28413	6.77562	0.00674

Apéndice 3.

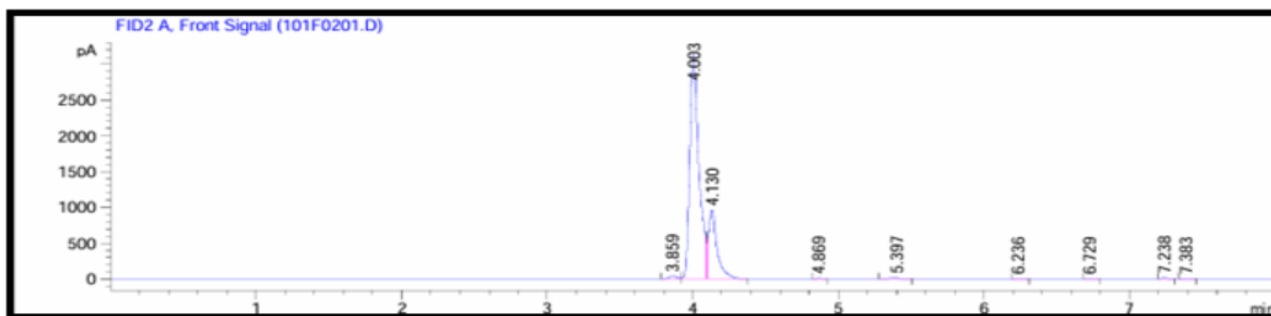
Cromatograma y reporte del patrón de muestra de mezcla (metanol-etanol).



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.850	BV	0.1055	3.68699e4	5930.53857	40.45072
2	4.078	VB	0.0830	5.42777e4	8800.11230	59.54928

Apéndice 4.

Cromatograma y reporte del lote 1.1(15% azúcar, 1%levadura, T ambiente).

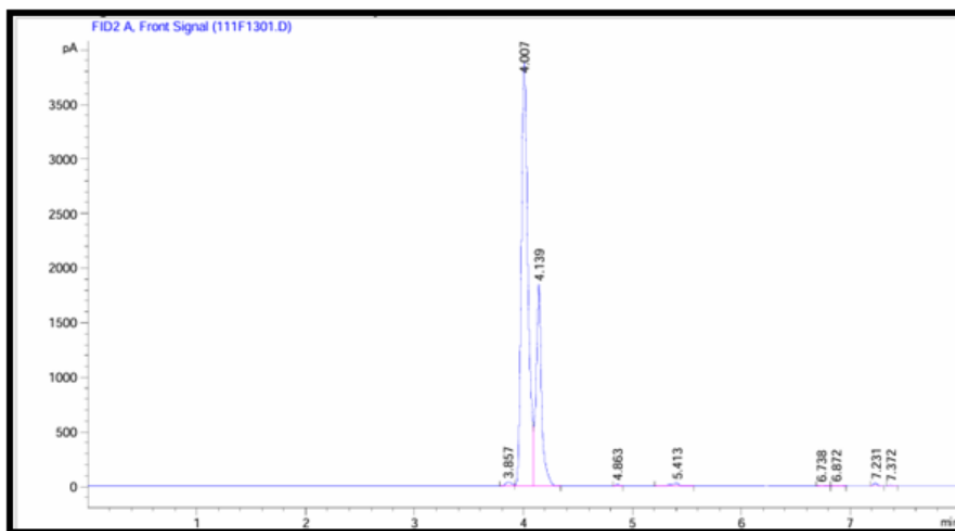


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.859	BV	0.0638	148.17699	34.69859	0.81760
2	4.003	VV	0.0645	1.38517e4	3140.04419	76.42982
3	4.130	VB	0.0583	3976.61011	961.10132	21.94190

El cromatograma obtenido mediante cromatografía de gases (GC-FID) de la figura 7 evidencia la presencia predominante de compuestos volátiles asociados al proceso de fermentación alcohólica. El análisis cromatográfico mostró picos de alta intensidad el segundo en 4.003 min con un área relativa de 76.43%, constituyéndose como el compuesto mayoritario de la muestra y su comportamiento sugiere una elevada presencia de etanol dentro del fermentado bajo condiciones anaerobias. Por otro lado, el tercer pico se encuentra a 4.130 min con un porcentaje de área correspondiente al 21.94%; debido a la cercanía entre ambos tiempos se atribuye a un alcohol superior. Así mismo, en este cromatograma se evidencia la ausencia de señales compatibles con altas concentraciones de metanol, esto es importante mencionarlo ya que este compuesto constituye un subproducto tóxico no deseado en procesos de producción de etanol.

Apéndice 5.

Cromatograma y reporte del lote 1.3(25% azúcar, 1%levadura, T ambiente).

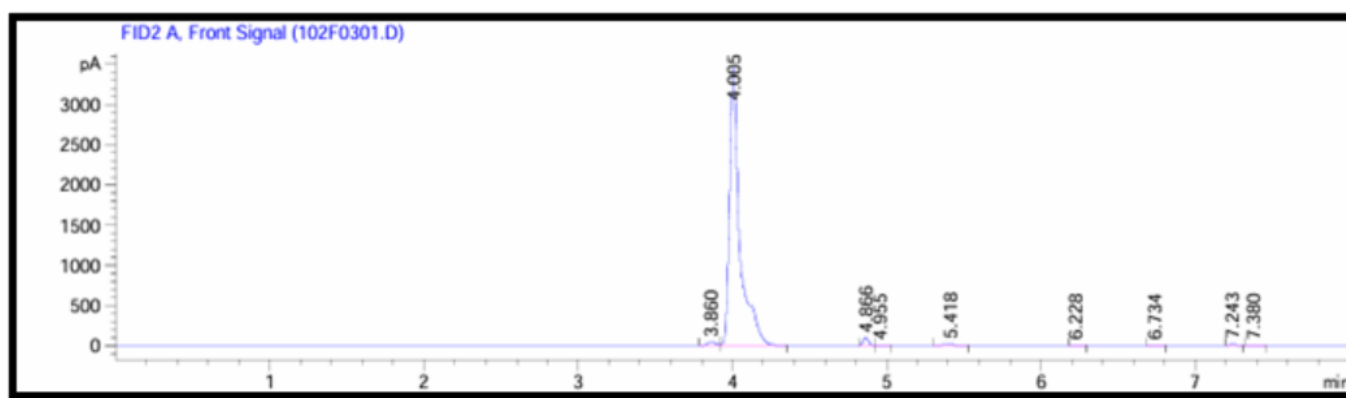


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.857	BV	0.0644	154.08235	36.36245	0.65272
2	4.007	VV	0.0653	1.67190e4	3879.43896	70.82496
3	4.139	VB	0.0516	6430.33789	1846.37720	27.24018

El cromatograma obtenido mediante GC-FID mostró un perfil que tiene como compuesto predominante en la muestra al etanol. Se destacó un pico con un tiempo de retención de 4.007 min y un porcentaje de área de 70.82%, indicando una conversión significativa de la sacarosa. Adicionalmente, se identificó otro pico relevante a 4.139 min con un área relativa de 27.24%, asociado a un alcohol superior. Los demás picos detectados presentaron áreas inferiores al 1%, lo que sugiere una baja formación de subproductos. Finalmente, no se evidenciaron señales significativas asociadas a metanol, indicando un proceso fermentativo adecuado y favorable para la producción de etanol a partir de sacarosa.

Apéndice 6.

Cromatograma y reporte del lote 2.1(15% azúcar, 1%levadura, T ambiente).



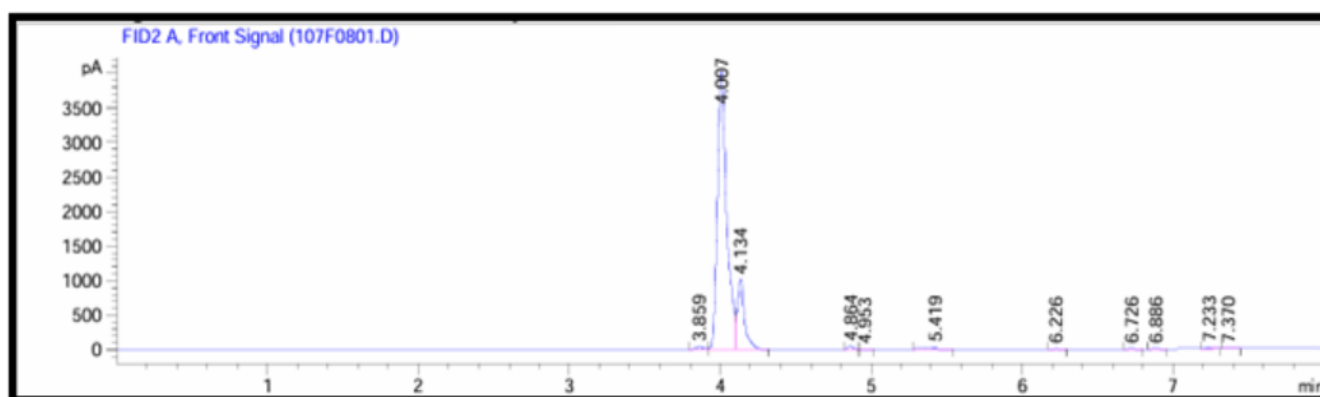
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.860	BV	0.0625	160.84496	38.69300	0.96258
2	4.005	VB	0.0675	1.61594e4	3457.04199	96.70571
3	4.866	BV	0.0376	234.97075	95.76314	1.40618

El cromatograma obtenido mediante GC-FID evidenció un perfil de fermentación alcohólica altamente eficiente, caracterizado por la presencia de un pico predominante a un tiempo de retención de 4.005 min con un porcentaje de área relativo de 96.70%, señalando nuevamente al etanol como compuesto mayoritario dentro de la muestra analizada. Este resultado demuestra que

bajo las condiciones experimentales establecidas la conversión de la sacarosa por parte de *Saccharomyces cerevisiae* se ve favorecida y es eficiente. Adicionalmente, se observó un pico de baja intensidad principalmente a 3.860 min, con áreas relativas de 0.96%, asociado posiblemente a metanol. La baja proporción de este representa un resultado favorable desde el punto de vista biotecnológico y de pureza del fermentado.

Apéndice 7.

Cromatograma y reporte del lote 2.2(20% azúcar, 1%levadura, T ambiente).



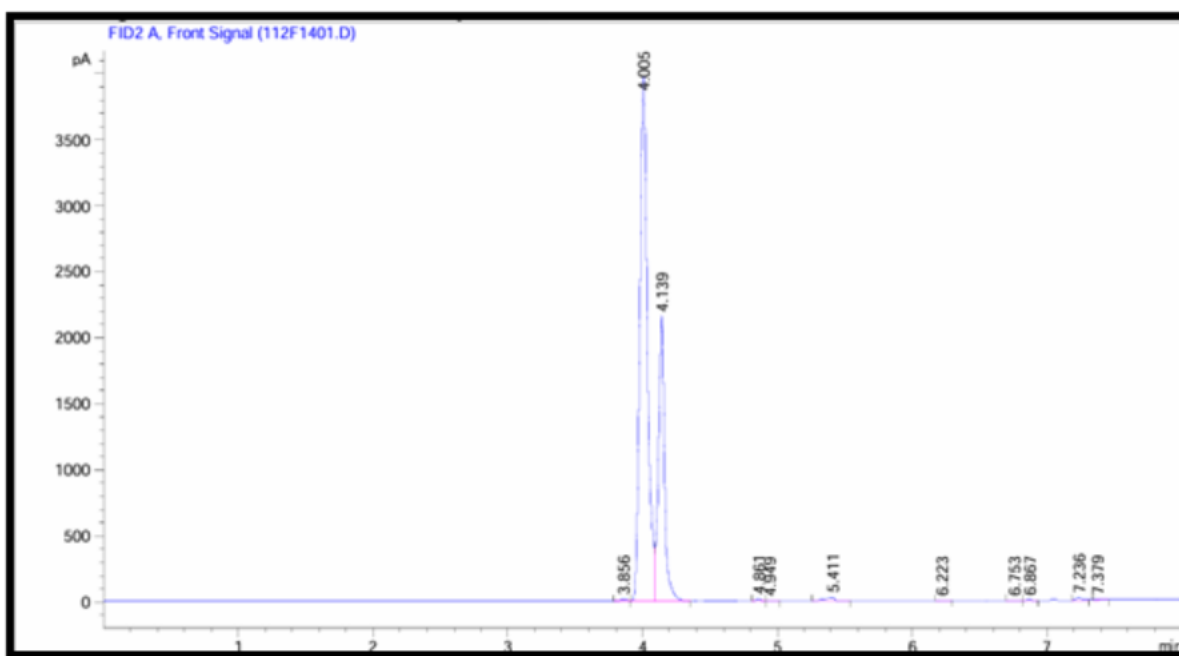
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.859	BV	0.0620	148.39067	35.29759	0.70481
2	4.007	VV	0.0641	1.72760e4	4023.10010	82.05561
3	4.134	VB	0.0472	3302.16797	1007.50146	15.68425

El cromatograma obtenido mediante GC-FID mostró un perfil típico de fermentación alcohólica con predominancia de un pico con tiempo de retención de 4.007 min y un porcentaje de área relativo de 82.05%, indicando una conversión eficiente de la sacarosa hacia etanol por acción metabólica de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, se observó otro pico relevante a 4.134 min con un área relativa de 15.68%, el cual se atribuye posiblemente a un alcohol superior. Como el porcentaje de los demás picos fueron inferiores al 1%, se demuestra una vez más que existe una

baja formación de subproductos (incluyendo el metanol) que conlleva un proceso fermentativo relativamente selectivo y limpio.

Apéndice 8.

Cromatograma y reporte del lote 2.3(25% azúcar, 1%levadura, T ambiente).



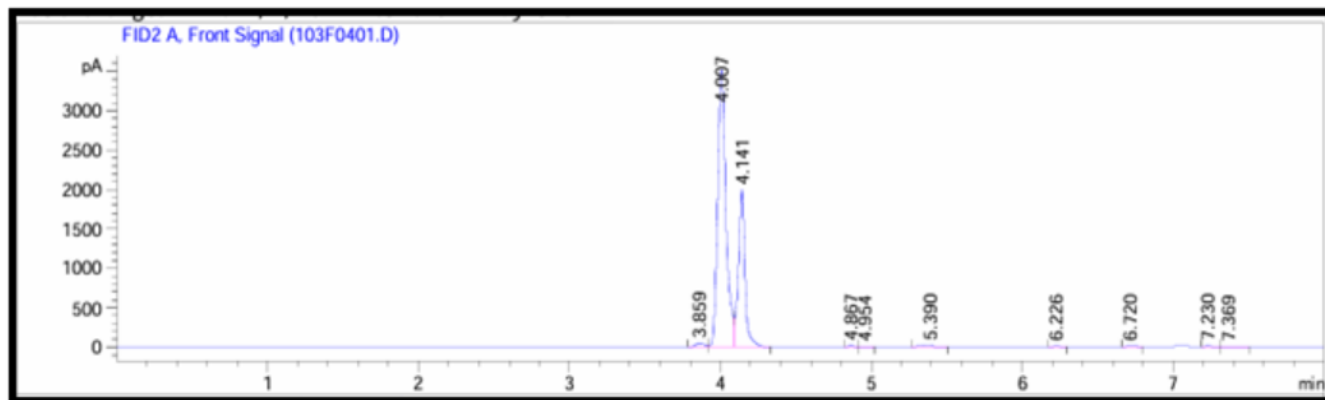
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.856	BV	0.0616	54.54335	13.65766	0.23853
2	4.005	VV	0.0613	1.57330e4	3965.00635	68.80332
3	4.139	VB	0.0479	6809.06396	2153.76025	29.77734

El cromatograma muestra un pico principal a 4.005 minutos con un área de 15,733 pA·s, que representa el 68.80% del área total, este puede ser identificado como etanol gracias a la comparación por estándar. Otro pico significativo aparece a 4.139 minutos con un área de 6,809 pA·s (29.78% del área total), correspondiente a un alcohol superior, este porcentaje es elevado y significativo, lo que sugiere condiciones de estrés fermentativo (alta concentración de azúcar, deficiencia de nutrientes nitrogenados o temperatura subóptima). El resto de los picos (11) suman

menos del 2% del área total, indicando una fermentación limpia. Por lo tanto, la calidad del cromatograma es excelente, con picos bien definidos y una línea base estable, demostrando la eficacia del método de extracción con cloroformo y las condiciones cromatográficas empleadas.

Apéndice 9.

Cromatograma y reporte del lote 3.1(15% azúcar, 2%levadura, T ambiente).



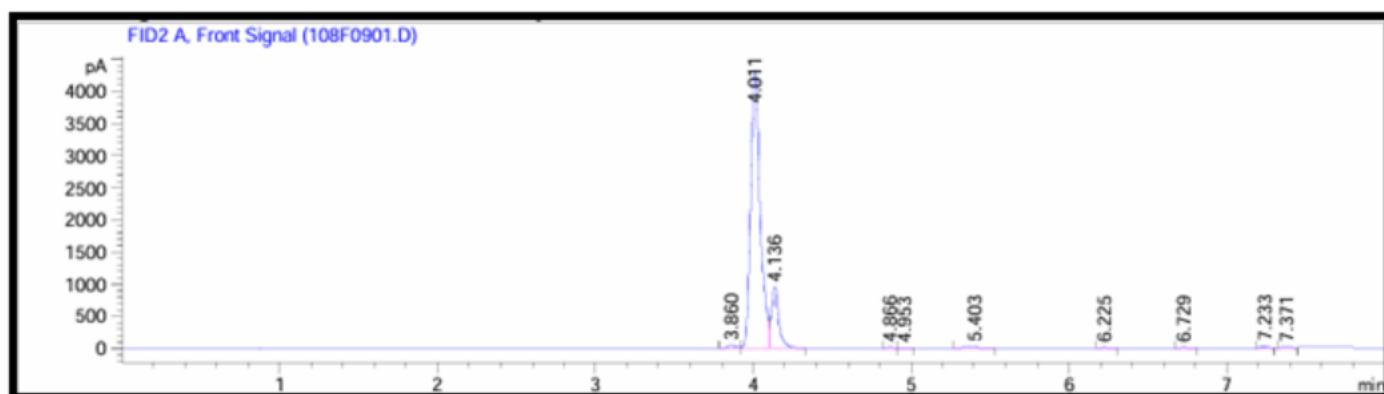
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.859	BV	0.0611	198.73503	49.21204	0.99195
2	4.007	VV	0.0590	1.35467e4	3511.22534	67.61568
3	4.141	VB	0.0457	6099.04199	1991.30603	30.44225

El cromatograma revela un pico mayoritario de etanol a 4.007 minutos con un área de 13,547 pA·s, que representa el 67.62% del área total de compuestos orgánicos detectados. Otro pico aparece a 4.141 minutos con un área de 6,099 pA·s que es 30.44% del área total, correspondiente a un alcohol superior, cuya proporción es alta y representa casi un tercio de todos los compuestos orgánicos volátiles; lo que indica una menor selectividad hacia la producción de etanol y evidencia condiciones fermentativas más estresantes (mayor concentración inicial de azúcar o deficiencia de nitrógeno). Los 8 picos restantes suman menos del 2% del área total y el

detector TCD (señal posterior) muestra pequeñas desviaciones que podrían corresponder a CO₂ residual o gases disueltos.

Apéndice 10.

Cromatograma y reporte del lote 3.2(20% azúcar, 2%levadura, T ambiente).

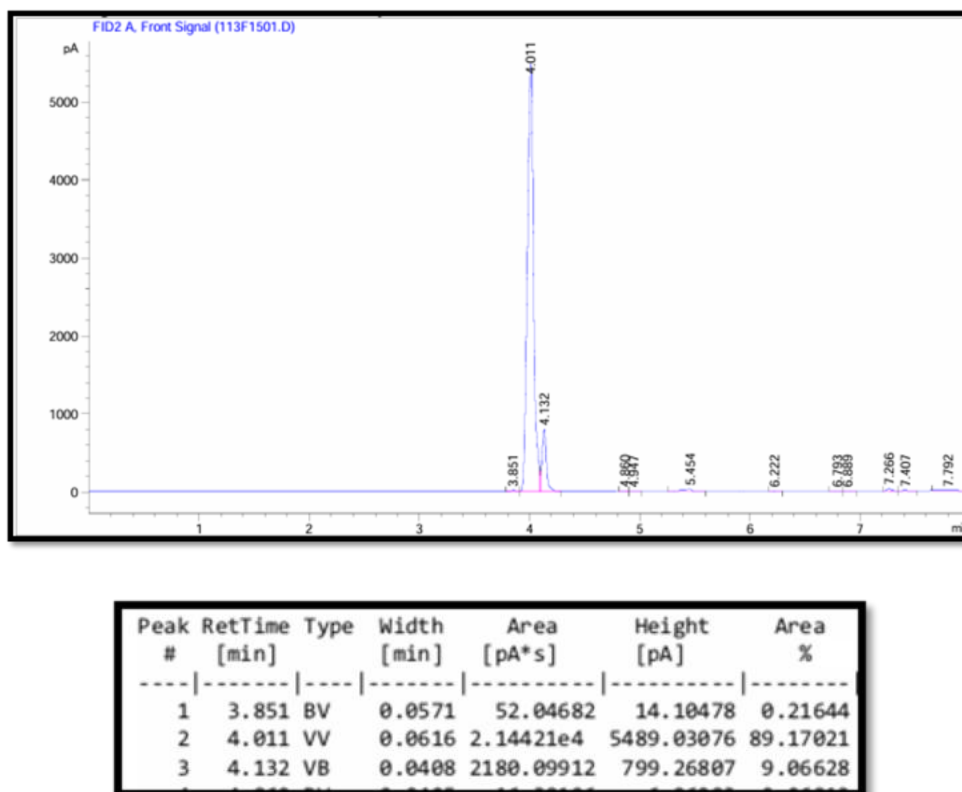


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.860	BV	0.0641	165.21468	39.25057	0.76813
2	4.011	VV	0.0627	1.80744e4	4327.79395	84.03271
3	4.136	VB	0.0463	3034.24634	947.89410	14.10700

Este cromatograma destaca notablemente de los anteriores por presentar una gran pureza de etanol; el pico a 4.011 minutos alcanza un área de 18,074 pA·s, que representa el 84.03% del área total de compuestos orgánicos volátiles; por otro lado, el pico identificado como un alcohol superior a 4.136 minutos tiene un área de 3,034 pA·s, que corresponde solo al 14.11% del área total, por lo tanto, lo que indica una excelente selectividad fermentativa hacia la producción de etanol y una mínima formación de subproductos no deseados. El resto de los picos (8) suman menos del 2% del área total, confirmando una fermentación limpia y eficiente.

Apéndice 11.

Cromatograma y reporte del lote 3.3(25% azúcar, 2%levadura, T ambiente).

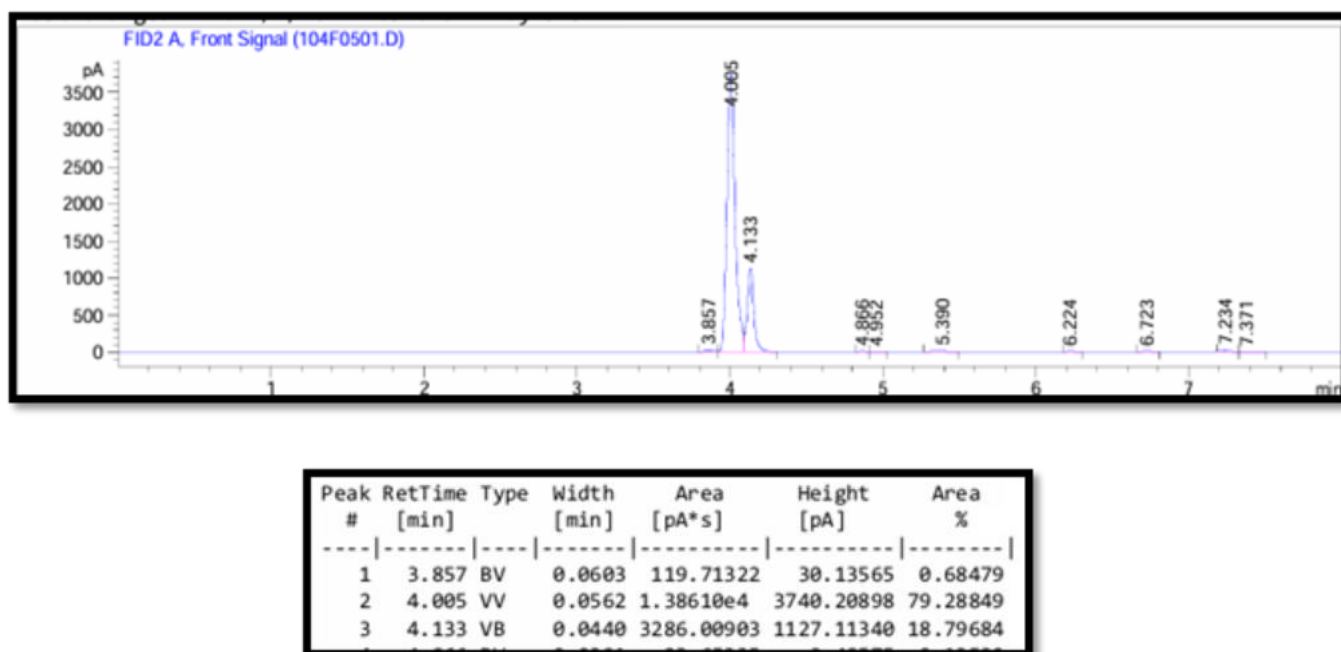


La muestra 3.3 presenta un buen desempeño, con un pico de etanol que representa el 89.17% del área total de compuestos orgánicos detectados, indicando una fermentación altamente eficiente con una mínima formación de subproductos. En contraste, las muestras 2.3 y 3.1 muestran los desempeños más bajos, con porcentajes de etanol de 68.80% y 67.62% respectivamente, lo que sugiere condiciones de alto estrés. La muestra 3.2 y la muestra 1.1 presentan desempeños intermedios, con porcentajes de etanol de 84.03% y 76.43% respectivamente. Esta variabilidad dentro de la misma condición experimental (misma levadura, mismo sustrato, temperatura ambiente) se atribuye principalmente a diferencias en la concentración inicial de sacarosa (15%, 20% o 25% p/v) y a la dosis de inóculo de levadura (1%, 2% o 3% p/v), donde los mejores resultados se obtienen con 20% de sacarosa y 2-3% de levadura, mientras que las condiciones más

estresantes (25% de sacarosa con 1% de levadura) producen la mayor formación de subproductos no deseados.

Apéndice 12.

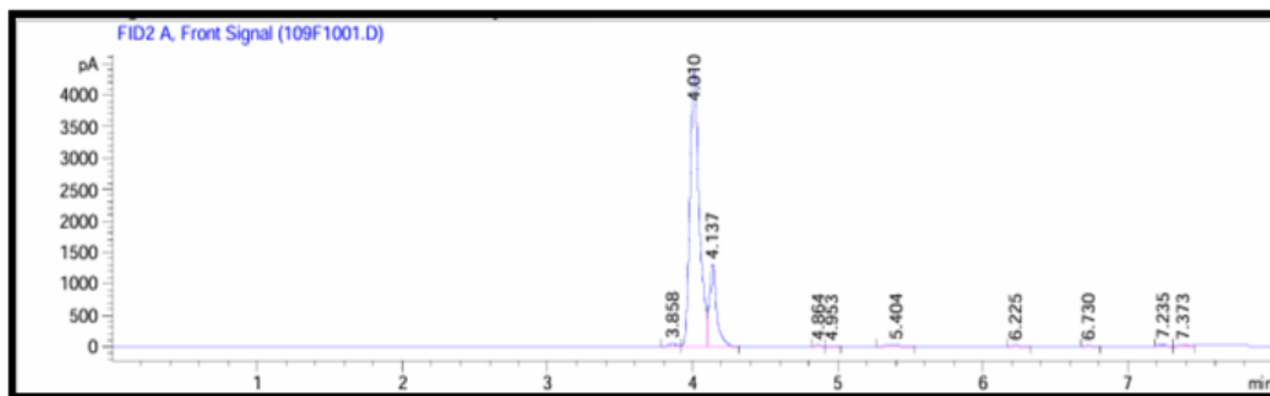
Cromatograma y reporte del lote 4.1(15% azúcar, 2%levadura, T ambiente).



Cromatograma de gases (GC-FID) correspondiente a la muestra 4.1, preparada con Levapan, sacarosa y temperatura ambiente. El pico de etanol a 4.005 minutos presenta un área de 13,861 pA·s, que representa el 79.29% del área total de los compuestos orgánicos detectados en dicha muestra; el pico de alcohol superior a 4.133 minutos tiene un área de 3,286 pA·s, correspondiente al 18.80% del área total, demostrando que esta muestra tiene un buen desempeño; sin embargo, sigue por debajo de las muestras 3.2 (5.96:1) y 3.3 (9.84:1). Los 8 picos restantes suman menos del 2% del área total, indicando una fermentación limpia. El detector TCD (señal posterior) muestra algunas fluctuaciones que podrían corresponder a CO₂ residual o pequeñas cantidades de aire en la muestra.

Apéndice 13.

Cromatograma y reporte del lote 4.2(20% azúcar, 2%levadura, T ambiente).

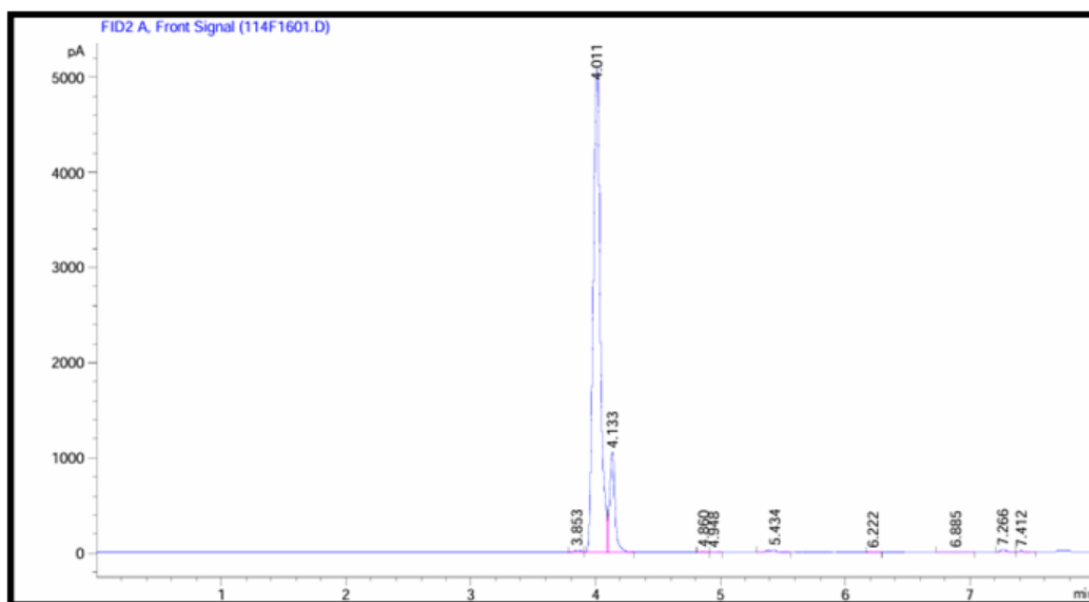


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.858	BV	0.0649	160.00223	37.44390	0.65812
2	4.010	VV	0.0663	1.94300e4	4419.14600	79.91941
3	4.137	VB	0.0490	4454.41699	1299.99524	18.32193

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 4.2, preparada con Levapan, sacarosa y temperatura ambiente. El pico de etanol a 4.010 minutos presenta un área de 19,430 pA·s, que representa el 79.92% del área total de compuestos orgánicos detectados, su diferencia con el porcentaje obtenido de la muestra 4.1 (79.29%) no es tan amplia. El pico del alcohol superior 4.137 minutos tiene un área de 4,454 pA·s, correspondiente al 18.32% del área total, mostrando un buen desempeño, igual que en la muestra anterior. Así mismo, la consistencia entre la muestra 4.1 y 4.2 (79.29% y 79.92% de etanol, relaciones 4.22 y 4.36) sugiere que ambas provienen de condiciones experimentales reproducibles y controladas.

Apéndice 14.

Cromatograma y reporte del lote 4.3(25% azúcar, 2%levadura, T ambiente).

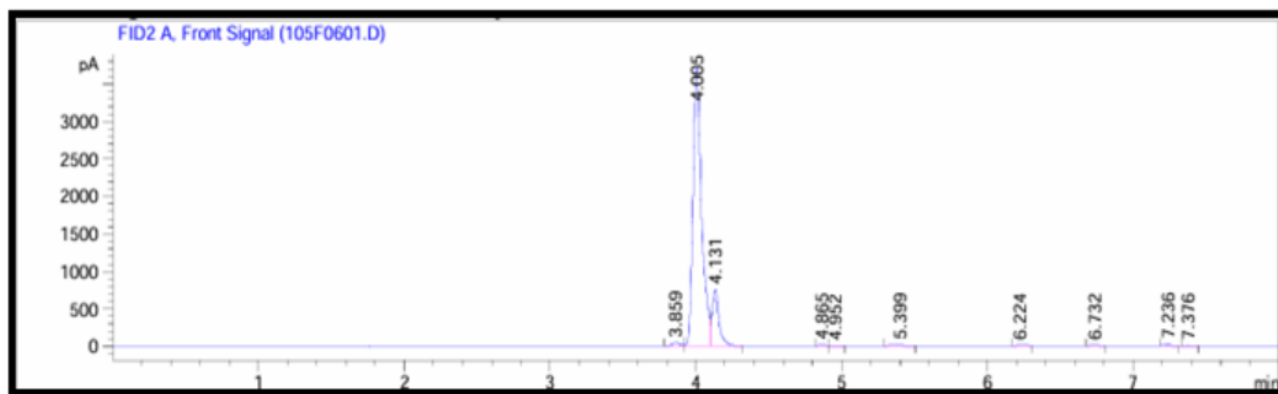


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.853	BV	0.0610	98.36864	24.97424	0.41338
2	4.011	VV	0.0615	2.02993e4	5094.91113	85.30401
3	4.133	VB	0.0445	3113.01001	1051.90381	13.08182

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 4.3, preparada con Levapan, sacarosa y temperatura ambiente, se destaca el pico de etanol a 4.011 minutos presenta un área de 20,299 pA·s, que representa el 85.30% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.133 minutos tiene un área de 3,113 pA·s, correspondiente solo al 13.08%, este excelente desempeño indica condiciones fermentativas cercanas al rango óptimo, demostrando que es posible alcanzar una selectividad del 85% hacia etanol incluso con levadura de panificación a temperatura ambiente, siempre que se manejen las condiciones correctas para reducir el estrés osmótico y nutricional.

Apéndice 15.

Cromatograma y reporte del lote 5.1(15% azúcar, 3%levadura, T ambiente).

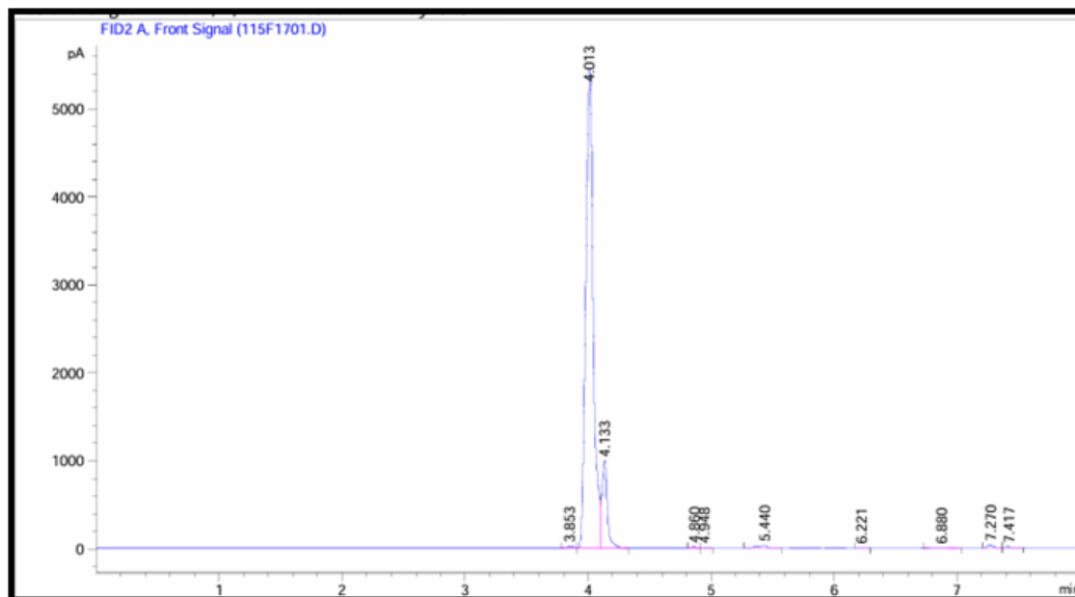


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.859	BV	0.0631	171.93599	40.82235	0.95568
2	4.005	VV	0.0607	1.51510e4	3708.51904	84.21441
3	4.131	VB	0.0477	2427.20605	750.74261	13.49120

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 5.1, preparada con Levapan, sacarosa y temperatura ambiente. Esta muestra presenta un desempeño muy bueno, el pico de etanol a 4.005 minutos alcanza un área de 15,151 pA·s, que representa el 84.21% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.131 minutos tiene un área de 2,427 pA·s, correspondiente al 13.49%, estos porcentajes indican una fermentación altamente eficiente, con mínima desviación metabólica hacia alcoholes superiores, es decir con óptimas condiciones de operación.

Apéndice 16.

Cromatograma y reporte del lote 5.3(25% azúcar, 3%levadura, T ambiente).



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.853	BV	0.0614	87.19605	21.93784	0.32658
2	4.013	VV	0.0667	2.31552e4	5434.82471	86.72436
3	4.133	VB	0.0450	3068.26172	993.10687	11.49172

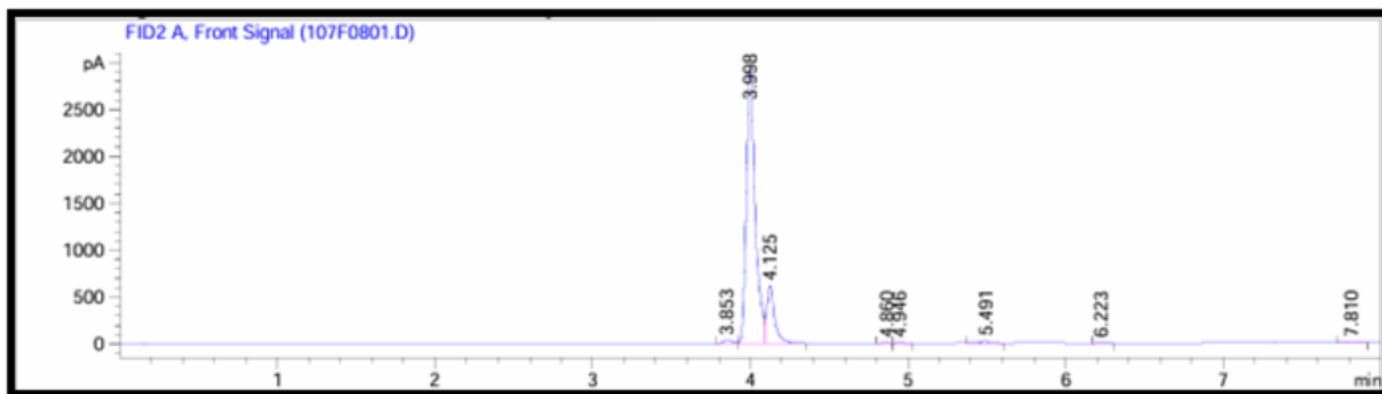
Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 5.3, preparada con Levapan, sacarosa al 25% p/v, 3% de levadura y temperatura ambiente. El pico de etanol a 4.013 minutos presenta un área de 23,155 pA·s, que representa el 86.72% del área total. El pico del alcohol superior a 4.133 minutos tiene un área de 3,068 pA·s, correspondiente al 11.49%, este resultado es bastante bueno considerando la alta concentración de azúcar (25% p/v), que genera una presión osmótica significativa. Sin embargo, se produjo selectividad del 86.72% hacia etanol, solo ligeramente inferior a la muestra 5.2.

En la evaluación base del proceso fermentativo con levadura Levapan, sacarosa como sustrato y temperatura ambiente, se identificó a la muestra 1.2 como el mejor resultado de toda la

fase, alcanzando una pureza del 98.19% de etanol en el área total de compuestos orgánicos detectados por cromatografía de gases, con una ausencia casi total del pico característico de los alcoholes superiores. Lo más notable de este resultado es que se obtuvo con solo 1% de levadura (8 g en 800 ml) y 20% de sacarosa, lo que demuestra que un tratamiento previo adecuado de la levadura, una temperatura ambiente estable y una correcta homogeneización del sistema pueden llevar a la levadura de panificación a un desempeño excepcional, comparable al de levaduras especializadas, utilizando una dosis mínima de inóculo y una concentración de azúcar moderadamente alta. Estos resultados son útiles para aplicaciones de bajo costo, donde minimizar la cantidad de levadura representa un ahorro significativo sin afectar la calidad ni el rendimiento del etanol producido.

Apéndice 17.

Cromatograma y reporte del lote 1.1T (15% azúcar, 1%levadura, 30°C).



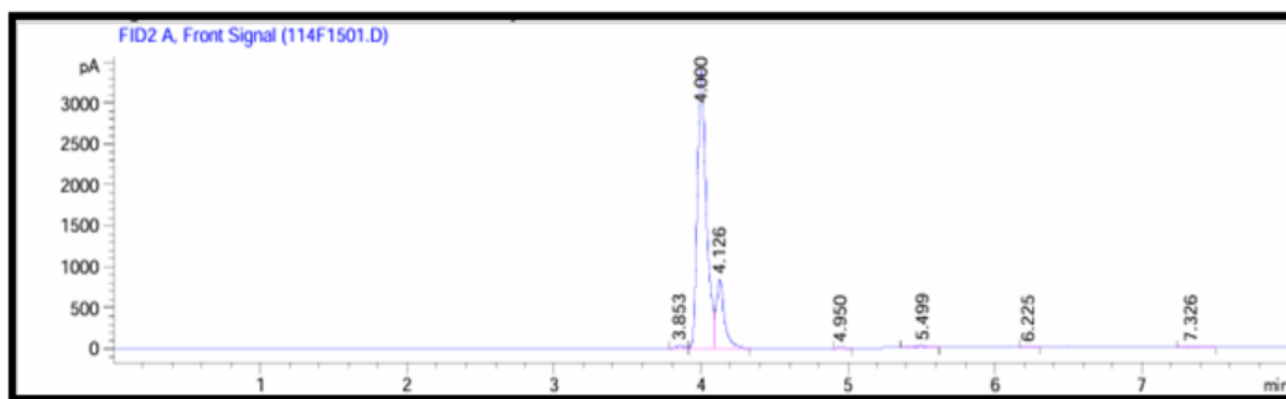
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.853	BV	0.0607	136.18190	34.00840	0.97663
2	3.998	VV	0.0587	1.15226e4	2942.11304	82.63445
3	4.125	VB	0.0498	2142.29346	612.69775	15.36343

Cromatograma de gases de la muestra 1.1T de la Parte 2 (sacarosa, levadura Levapan, temperatura controlada en baño María). El pico de etanol a 3.998 minutos presenta un área de

11,523 pA·s, que representa el 82.63% del área total. El pico del alcohol superior a 4.125 minutos tiene un área de 2,142 pA·s, correspondiente al 15.36% del área total de compuestos orgánicos detectados, este desempeño se encuentra a un nivel similar a las mejores muestras de temperatura ambiente de la Parte 1 (como muestra 4.3 con 85.30% y relación 6.52). Destaca que el pico de alcohol superior no se ve ensanchado, lo que sugiere que mantener la temperatura controlada redujo el estrés osmótico, permitiendo una fermentación limpia. Los picos secundarios suman menos del 2% del área total.

Apéndice 18.

Cromatograma y reporte del lote 1.2T (20% azúcar, 1%levadura, 30°C).



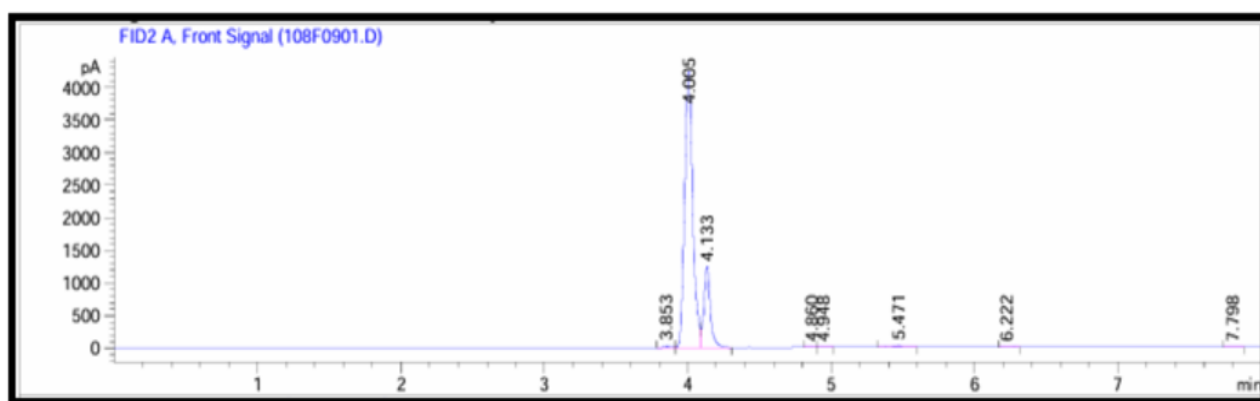
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.853	BV	0.0612	106.99615	26.43846	0.59550
2	4.000	VV	0.0640	1.45275e4	3387.78760	80.85477
3	4.126	VB	0.0539	3158.80615	838.71460	17.58074

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.2T, preparada con Levapan, sacarosa al 20% p/v, 1% de levadura y temperatura controlada de 30°C (Parte 2). El pico de etanol a 4.000 minutos presenta un área de 14,527 pA·s, que representa el 80.85% del área total. El pico del alcohol superior a 4.126 minutos tiene un área de 3,159 pA·s, correspondiente al 17.58% del área total; en comparación con condiciones equivalentes de la Parte 1 (20% azúcar, 1% levadura,

temperatura ambiente), se redujo la calidad de la muestra, puesto que en la 1.2 a temperatura ambiente el pico de etanol presentó un porcentaje de área total de 98.19% en compuestos orgánicos detectados, lo que indica que el aumento de temperatura a 30°C disminuyó significativamente la selectividad hacia etanol, sugiriendo que en ciertas condiciones también es posible conseguir una buena conversión del proceso fermentativo sin necesidad de mantener una temperatura controlada.

Apéndice 19.

Cromatograma y reporte del lote 1.3T (25% azúcar, 1%levadura, 30°C).



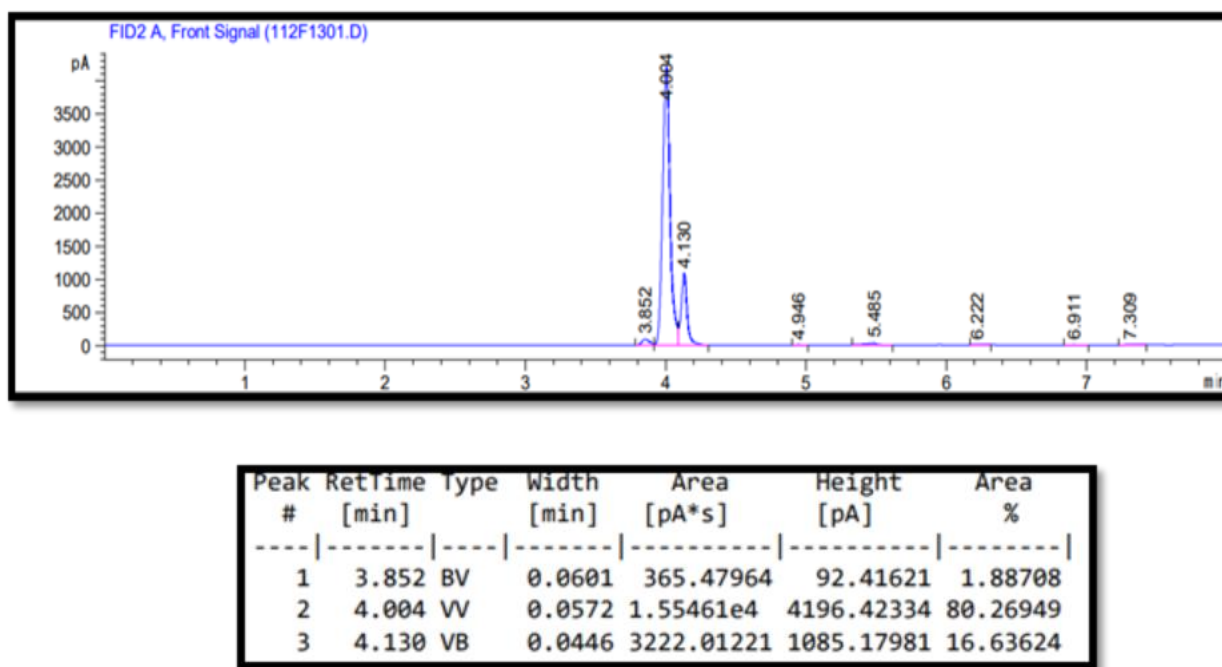
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.853	BV	0.0581	93.14165	24.07749	0.44752
2	4.005	VV	0.0611	1.67357e4	4239.17871	80.41058
3	4.133	VB	0.0459	3820.35156	1240.19067	18.35581

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.3T, preparada con Levapan, sacarosa al 25% p/v, 1% de levadura y temperatura controlada de 30°C (Parte 2). El pico de etanol a 4.005 minutos presenta un área de 16,736 pA·s, que representa el 80.41% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.133 minutos tiene un área de 3,820 pA·s, correspondiente al 18.36% del área total, en comparación con condiciones equivalentes de la Parte 1 (25% azúcar, 1% levadura, temperatura ambiente), donde la muestra 1.3 mostró solo un 70.82% de etanol, el aumento de temperatura a 30°C mejoró drásticamente la selectividad hacia etanol,

incrementando el porcentaje de etanol en casi 10 puntos porcentuales (del 70.82% al 80.41%) y reduciendo los alcoholes superiores del 27.24% al 18.4%. Este resultado demuestra que el control térmico a 30°C es especialmente beneficioso en condiciones de alto estrés osmótico, es decir, con altas concentraciones de sustrato y baja dosis de inóculo (25% de azúcar con 1% de levadura), permitiendo que la levadura Levapan tolere concentraciones elevadas de sustrato que a temperatura ambiente resultaban altamente inhibitorias.

Apéndice 20.

Cromatograma y reporte del lote 1.4T (15% azúcar, 2%levadura, 30°C).

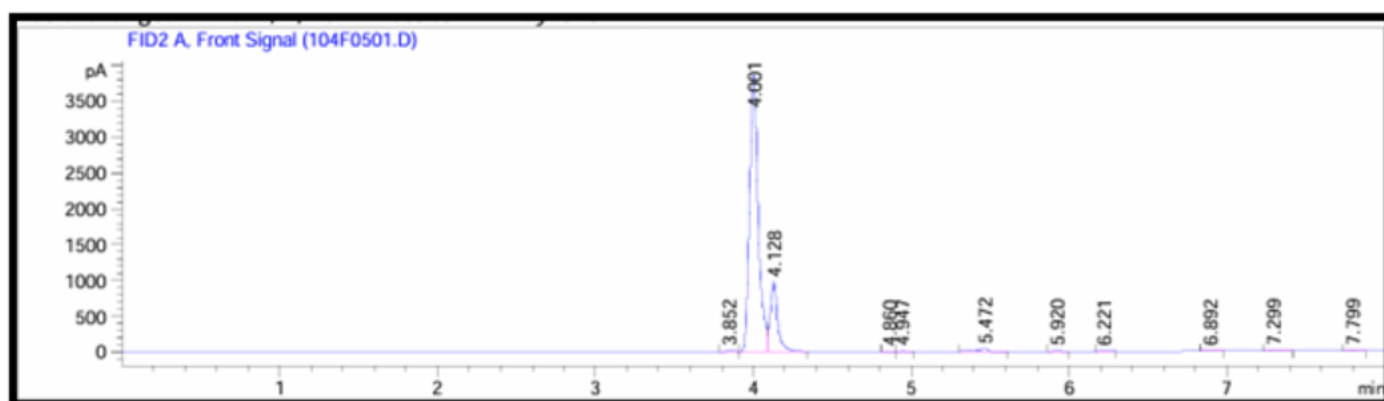


Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.4T, preparada con Levapan, sacarosa al 15% p/v, 2% de levadura y temperatura controlada de 30°C (Parte 2). El pico de etanol a 4.004 minutos presenta un área de 15,546 pA·s, que representa el 80.27% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.130 minutos tiene un área de 3,222 pA·s, correspondiente al 16.64% del área total, este resultado es consistente con las muestras 1.2T (20% azúcar) y 1.3T (25% azúcar), indicando que a 30°C la selectividad hacia etanol se mantiene en un

rango del 80-81% independientemente de la concentración de azúcar (15-25%), siempre que la dosis de levadura sea suficiente (2%). En comparación con condiciones equivalentes de la Parte 1 (15% azúcar, 2% levadura, temperatura ambiente), donde la muestra 4.1 mostró 79.29% de etanol, la mejora por efecto de la temperatura es baja, pero, confirma que 30°C es una temperatura aceptable para la fermentación con Levapan y con dosis de azúcar moderadas.

Apéndice 21.

Cromatograma y reporte del lote 1.6T (25% azúcar, 2%levadura, 30°C).



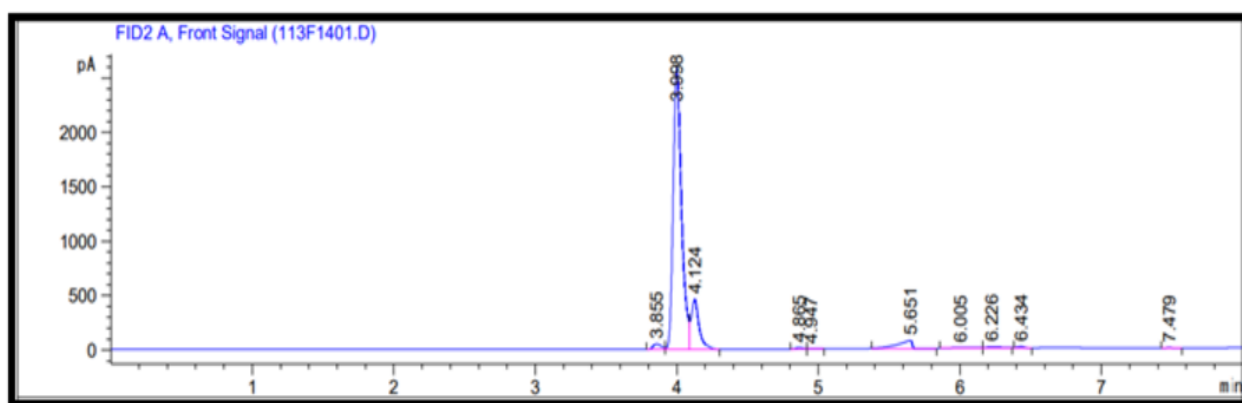
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.852	BV	0.0584	51.19933	13.44394	0.28015
2	4.001	VV	0.0578	1.48339e4	3864.39404	81.16856
3	4.128	VB	0.0465	3113.54907	969.48212	17.03679

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.6T, preparada con Levapan, sacarosa al 25% p/v, 2% de levadura y temperatura controlada de 30°C (Parte 2). El pico de etanol a 4.001 minutos presenta un área de 14,834 pA·s, que representa el 81.17% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.128 minutos tiene un área de 3,114 pA·s, correspondiente al 17.04% del área total. En comparación con la condición equivalente con 1% de levadura (muestra 1.3T, 25% azúcar, 1% levadura, 30°C), que mostró 80.41% de etanol, el

aumento de la dosis de levadura al 2% mejoró ligeramente la selectividad (80.41% → 81.17%); sin embargo, este resultado no alcanza el desempeño excepcional logrado con 20% azúcar y 2% levadura a 30°C (muestra 1.5T, que alcanzó 97.83% de etanol). Esto indica que, incluso a 30°C y con el doble de la dosis del inóculo, la concentración del 25% de azúcar genera un estrés osmótico que limita y reduce la obtención de etanol.

Apéndice 22.

Cromatograma y reporte del lote miel 1.1 (15% miel, 1%levadura, T ambiente).



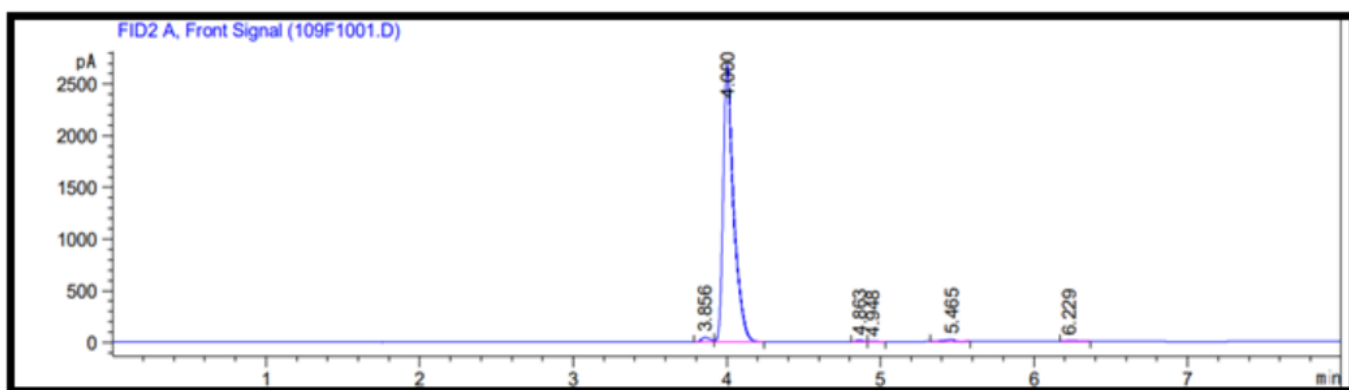
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.855	BV	0.0626	203.39201	49.81863	1.51504
2	3.998	VV	0.0617	1.05588e4	2582.75317	78.65111
3	4.124	VB	0.0559	1770.73584	459.98462	13.18997

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.1M, preparada con miel de abejas al 15% p/v, 1% de Levapan y temperatura ambiente (Fase 3). El pico de etanol a 3.998 minutos presenta un área de 10,559 pA·s, que representa el 78.65% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.124 minutos tiene un área de 1,771 pA·s, correspondiente al 13.19% del área total; el desempeño con miel tuvo un menor porcentaje de conversión de etanol, puesto que, presenta una mayor diversidad de subproductos, lo que sugiere

que la miel, a pesar de ser un sustrato fermentable, introduce compuestos que se detectan en el cromatograma o que desvían parcialmente el metabolismo.

Apéndice 23.

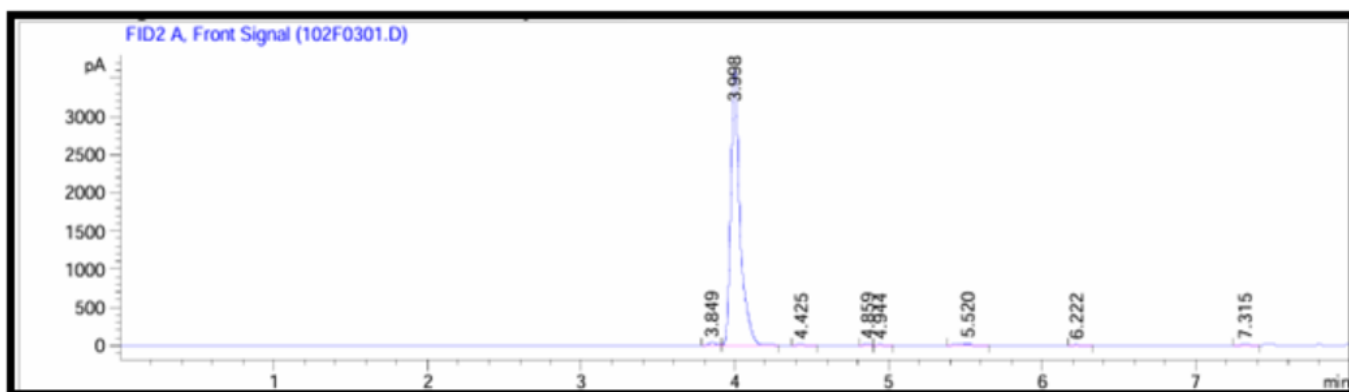
Cromatograma y reporte del lote miel 1.2 (20% miel, 1%levadura, T ambiente).



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.856	BV	0.0621	184.48470	44.76789	1.40922
2	4.000	VB	0.0684	1.27132e4	2677.83936	97.11216
3	4.863	BV	0.0442	48.99196	16.70039	0.37423

Apéndice 24.

Cromatograma y reporte del lote mucilago 1.1 (17% mucilago, 1%levadura, T ambiente).

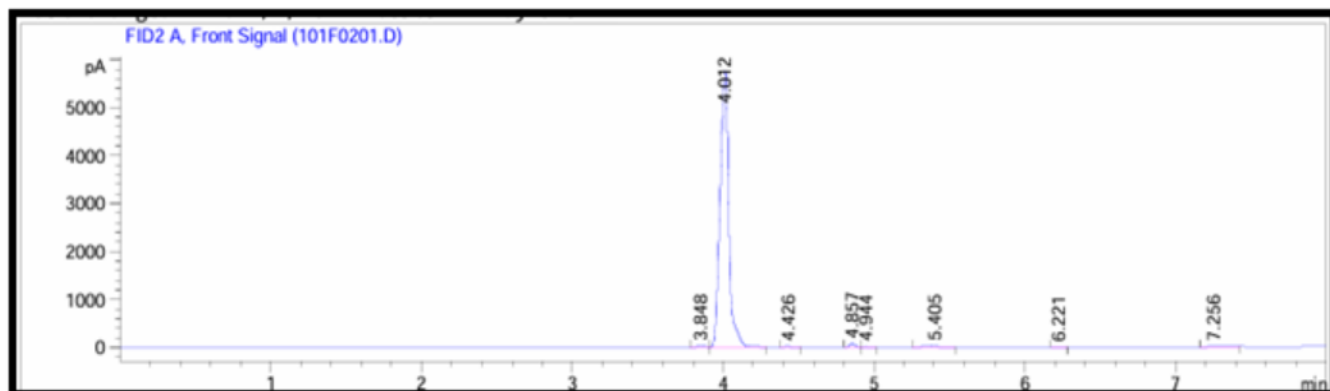


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.849	BV	0.0577	130.95006	34.15520	0.84735
2	3.998	VB	0.0616	1.50373e4	3607.29468	97.30390
3	4.425	BB	0.0477	25.91060	8.01497	0.16766

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.1C, preparada con mucílago de cacao al 17% p/v (equivalente en °Bx), 1% de Levapan y temperatura ambiente (Fase 4). El pico de etanol a 3.998 minutos presenta un área de 15,037 pA·s, que representa el 97.30% del área total de compuestos orgánicos detectados, un valor alto que demuestra una fermentación limpia y eficiente. Los otros 6 picos suman menos del 2% del área total; cabe resaltar que, a diferencia de lo observado con miel al 15% (que solo alcanzó 78.7% de etanol), el mucílago de cacao a 17% alcanzó una selectividad del 97.3%, comparable a los mejores resultados del estudio en general, esto confirma que el mucílago de cacao es un sustrato prometedor para la producción de etanol, incluso con baja dosis de inóculo (1% de levadura) y sin control de temperatura, gracias a su composición equilibrada de azúcares (principalmente glucosa y fructosa) y su baja presión osmótica.

Apéndice 25.

Cromatograma y reporte del lote mucilago 1.2 (10% mucilago, 1%levadura, T ambiente).

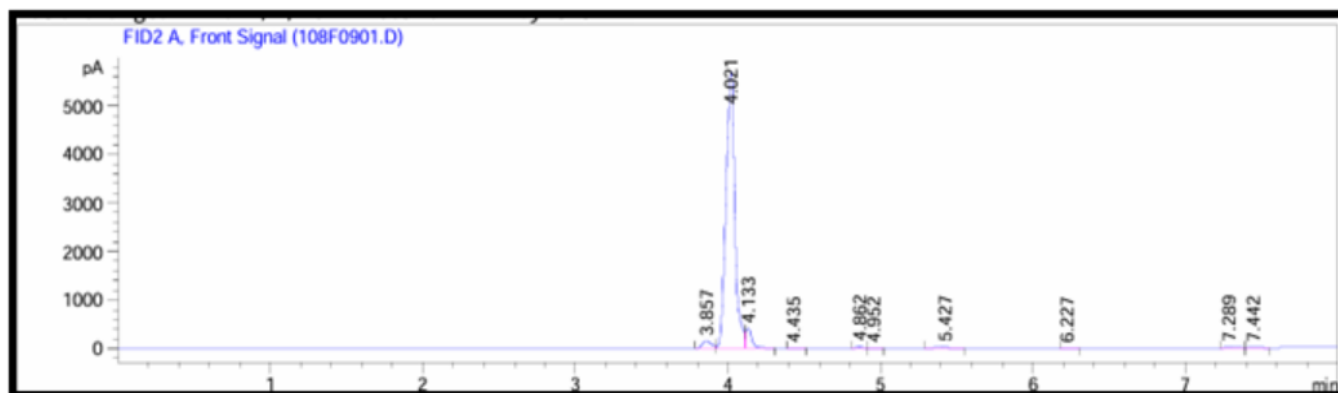


Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.848	BV	0.0568	102.24215	27.86417	0.43161
2	4.012	VB	0.0639	2.31730e4	5767.97754	97.82442
3	4.426	BB	0.0418	22.36531	8.20808	0.09441

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.2C, preparada con mucílago de cacao al 10% p/v, 1% de Levapan y temperatura ambiente (Fase 4). El pico de etanol a 4.012 minutos presenta un área de 23,173 pA·s, que representa el 97.82% del área total de compuestos orgánicos detectados, uno de los más altos de todo el estudio. Los otros 6 picos suman menos del 1.5% del área total, superando incluso al resultado obtenido con mucílago al 17% (97.30%), demostrando que utilizar el 10% de mucílago con 1% de levadura a pesar de tener una baja concentración de sustrato y de inóculo, alcanza una selectividad del 97.8% hacia etanol; evidenciando las diferencias que presentan todas las fuentes de azúcar utilizadas. Trabajar con una baja concentración de azúcares (10%) reduce la presión osmótica sobre las células de levadura, implica menor costo de materia prima y mantiene una eficiencia excepcional.

Apéndice 26.

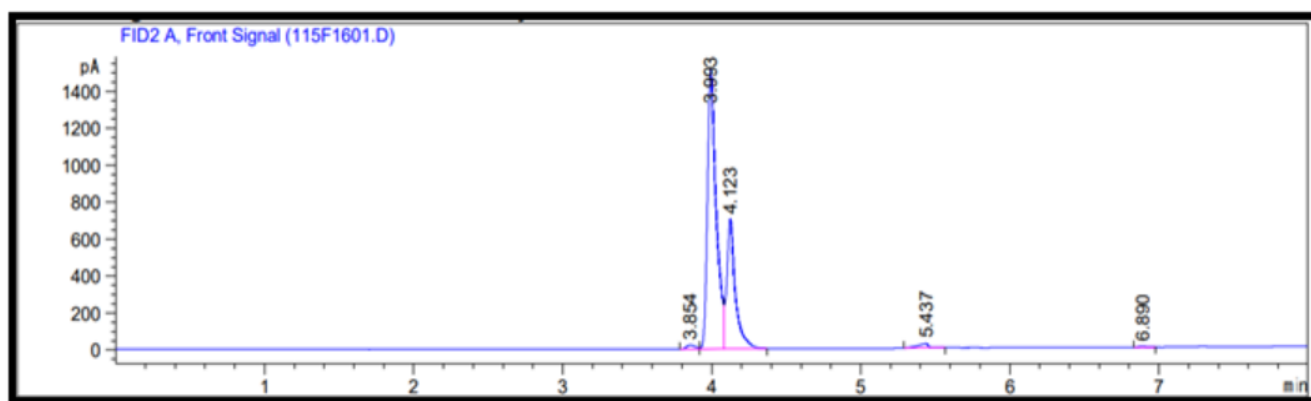
Cromatograma y reporte del lote mucilago 1.4 (25% mucilago, 1%levadura, T ambiente).



Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.857	BV	0.0610	610.69409	151.56519	2.39629
2	4.021	VV	0.0649	2.34040e4	5704.78174	91.83437
3	4.133	VB	0.0410	1140.53662	403.09076	4.47532

Apéndice 27.

Cromatograma y reporte de lote levadura modificada 1.2 (25% azúcar, 1 g levadura, T ambiente).



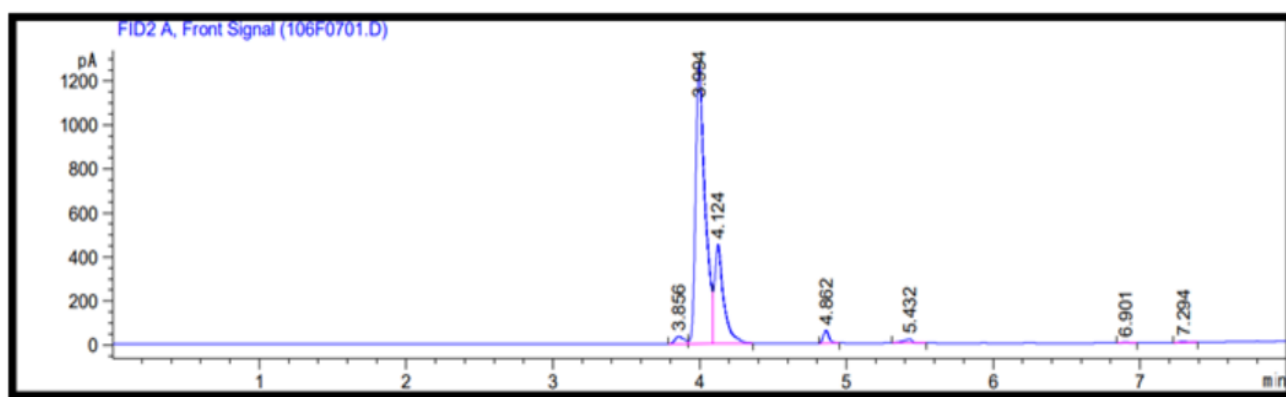
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.854	BV	0.0602	91.61040	22.65900	0.99437
2	3.993	VV	0.0597	6162.77441	1505.82593	66.89282
3	4.123	VB	0.0568	2813.09644	701.63660	30.53429

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.2LN, preparada con sacarosa al 25% p/v, 1 g de levadura Lalvin EC1118™ y temperatura ambiente (Fase 6). El pico de etanol a 3.993 minutos presenta un área de 6,163 pA·s, que representa el 66.89% del área total de compuestos orgánicos detectados, un valor inferior al obtenido con 20% de azúcar (76.84%). El pico del alcohol superior a 4.123 minutos tiene un área de 2,813 pA·s, correspondiente al 30.53% del área total, este resultado demuestra que la concentración del 25% de sacarosa es excesiva para la levadura EC1118 con solo 1 g de inóculo a temperatura ambiente, causando que el metabolismo

se vea afectado y comience a producir otros subproductos no deseados, confirmando que 1 g de EC1118 no es suficiente para fermentar eficientemente 25% de azúcar a temperatura ambiente, y que se requiere aumentar la dosis de inóculo a 2 g o reducir la concentración de azúcar para evitar la inhibición.

Apéndice 28.

Cromatograma y reporte del lote de levadura modificada 1.3 (15% azúcar, 2 g levadura, T ambiente).



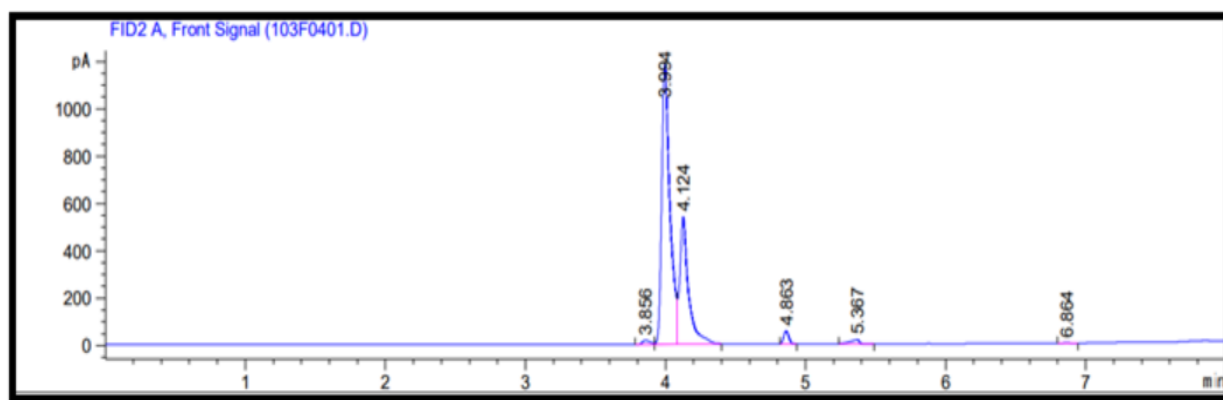
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.856	BV	0.0646	146.81902	33.84791	1.82390
2	3.994	VV	0.0651	5673.68359	1269.88940	70.48288
3	4.124	VB	0.0609	1966.71631	450.74432	24.43207

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.3LN, preparada con sacarosa al 15% p/v, 2 g de levadura Lalvin EC1118 y temperatura ambiente (Fase 6). El pico de etanol a 3.994 minutos presenta un área de 5,674 pA·s, que representa el 70.48% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.124 minutos tiene un área de 1,967 pA·s, correspondiente al 24.43% del área total, por lo tanto, la variedad de picos en este cromatograma indica el bajo rendimiento que tuvo la levadura EC1118 con 2 g de inóculo, especialmente considerando que la concentración de azúcar es solo del 15% (la más baja del estudio). En

comparación con la levadura Levapan no logra competir, alcanzando solo 70.48% de selectividad; por consiguiente, 2 g de EC1118 sigue siendo una dosis insuficiente para temperatura ambiente, o probablemente la cepa EC1118 requiere temperaturas más altas (30°C) para expresar su máximo potencial, tal como indica su ficha técnica (rango de fermentación 10-30°C, óptimo cerca de 30°C). A temperatura ambiente (24°C), su desempeño es limitado incluso con el doble de inóculo.

Apéndice 29.

Cromatograma y reporte del lote de levadura modificada 1.4 (20% azúcar, 2 g levadura, T ambiente).



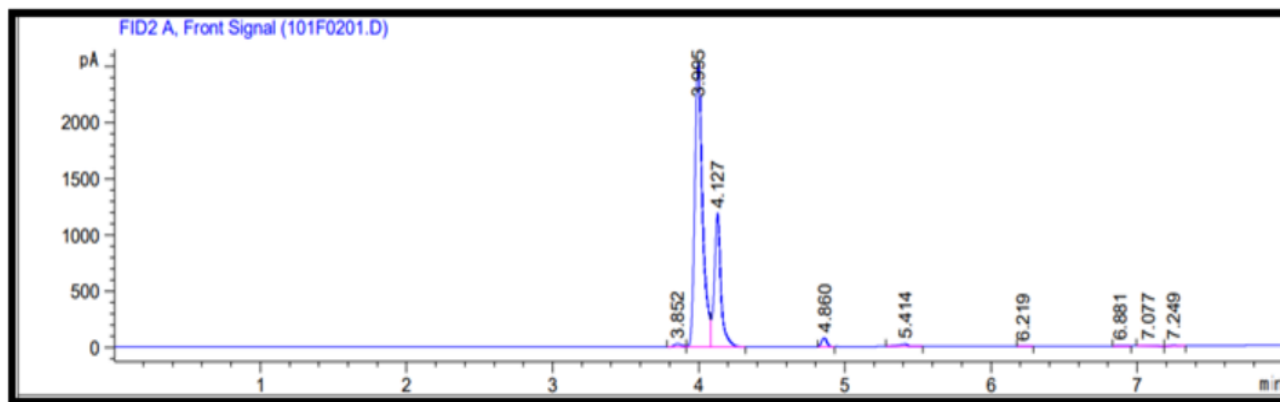
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.856	BV	0.0599	69.50119	17.29540	0.93536
2	3.994	VV	0.0595	4808.13916	1181.61633	64.70904
3	4.124	VB	0.0603	2321.10962	537.93036	31.23802

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.4LN, preparada con sacarosa al 20% p/v, 2 g de levadura Lalvin EC1118 y temperatura ambiente (Fase 6). El pico de etanol a 3.994 minutos presenta un área de 4,808 pA·s, que representa el 64.71% del área total de compuestos orgánicos detectados, un valor muy bajo (inclusive menor que el obtenido con solo 1 g de EC1118 en la misma concentración de sacarosa). El pico del alcohol superior a 4.124 minutos tiene un área

de 2,321 pA·s, correspondiente al 31.24% del área total. Este resultado no es favorable, ya que duplicar la dosis de levadura (de 1g a 2g) empeoró la selectividad (76.8% → 64.7%) y aumentó los alcoholes superiores (18.8% → 31.2%). Esto sugiere que con 2g de EC1118 a temperatura ambiente se puede haber generado una competencia por nutrientes o una mortalidad celular temprana que liberó compuestos intracelulares, o que la mayor biomasa inicial consumió rápidamente el oxígeno disponible y entró en fase estacionaria sin haber metabolizado completamente los azúcares; así mismo, es posible que se haya realizado mal el protocolo de rehidratación sugerido por el fabricante (35-37°C) y esto influyó negativamente la viabilidad de las células.

Apéndice 30.

Cromatograma y reporte del lote de levadura modificada 1.5 (25% azúcar, 2 g levadura, T ambiente).



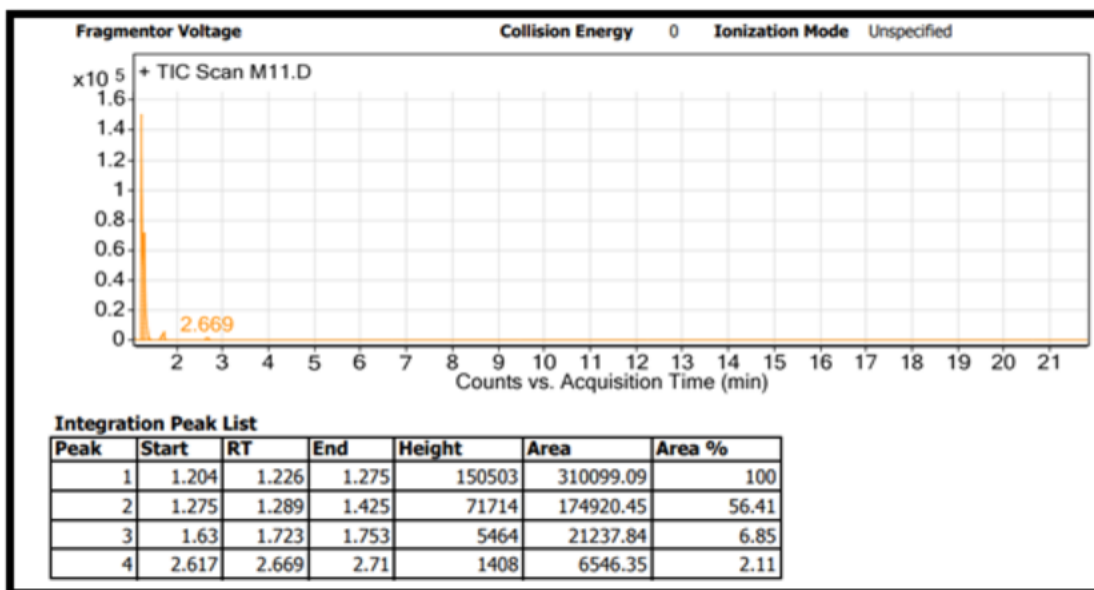
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.852	BV	0.0600	115.14942	29.20508	0.84694
2	3.995	VV	0.0554	9390.80078	2523.44019	69.07054
3	4.127	VB	0.0468	3734.31738	1185.24109	27.46638

Cromatograma de gases (GC-FID) de la muestra 1.5LN, preparada con sacarosa al 25% p/v, 2 g de levadura Lalvin EC1118™ y temperatura ambiente (Fase 6). El pico de etanol a 3.995 minutos presenta un área de 9,391 pA·s, que representa el 69.07% del área total de compuestos orgánicos detectados. El pico del alcohol superior a 4.127 minutos tiene un área de 3,734 pA·s, correspondiente al 27.47% del área total, en comparación con 1 g de EC1118 (1.2LN: 66.89% etanol), el aumento de la dosis a 2 g mejoró ligeramente la selectividad (69.07% vs 66.89%) y redujo la formación de alcoholes superiores (27.47% vs 30.53%). Sin embargo, este resultado sigue siendo muy bajo para el potencial declarado de EC1118.

La levadura Lalvin EC1118 no es adecuada para fermentación a temperatura ambiente con sacarosa, alcanzando selectividades máximas de solo 76.8% (con 20% azúcar y 1g de inóculo). Aumentar la dosis a 2g no mejoró los resultados e incluso empeoró en algunos casos (20% azúcar). Para lograr todo el potencial de esta levadura (tolerancia al alcohol del 18% v/v, fermentaciones limpias), es importante mantener una temperatura controlada, rehidratación óptima a 35-37°C en agua pura, y dosis según ficha técnica (0.2-0.4 g/L), que sería aproximadamente 0.16-0.32 g en 800 ml (muy inferior a los 1-2 g utilizados).

Apéndice 31.

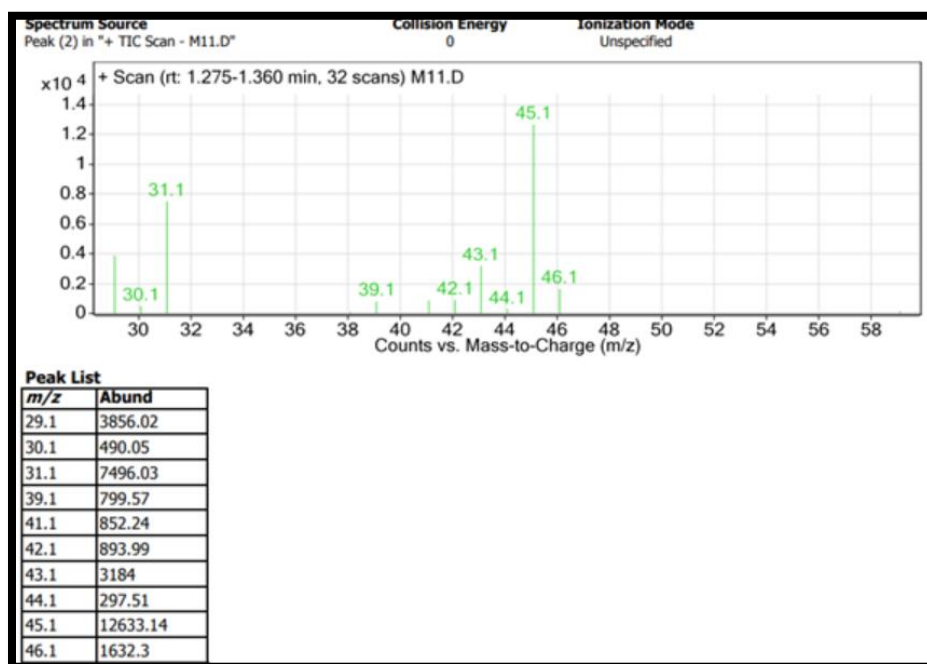
Cromatograma de 1.1 M por GC-MS.



Apéndice 32.

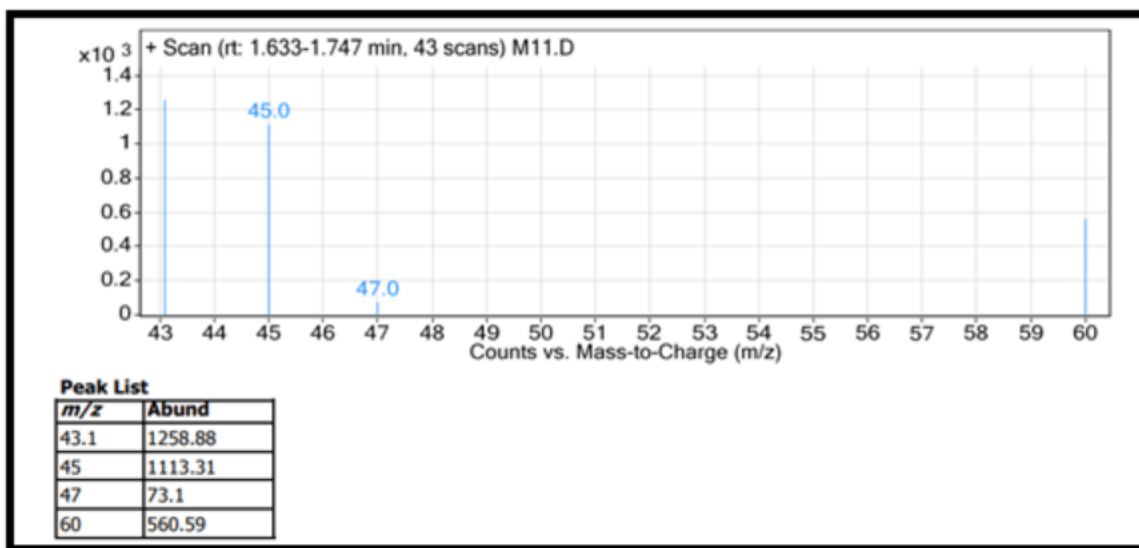
Identificación de señales características de metanol, etanol y sus isotopos de la muestra

1.1M.



Apéndice 33.

Identificación del pico característico del isopropanol en la muestra 1.1 M.



El análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de la muestra 1.1M (miel al 15% p/v, 1% levadura, temperatura ambiente) facilitó la identificación de los compuestos mayoritarios presentes en el fermentado. El pico con tiempo de retención de 1.21-1.27 min (99.09% del área total) corresponde a un espectro de masas con ión molecular m/z 46 y fragmentos característicos en m/z 45, 31 y 29, confirmando que se trata del etanol. El pico secundario a 1.27-1.42 min (0.45% del área total) mostró un patrón de fragmentación similar al del isopropanol (alcohol superior), con fragmentos en m/z 45, 43, 31 y 29, y debido a la ausencia de iones característicos de butanol o alcoholes superiores de mayor peso molecular.

En comparación con la muestra 1.3T (25% azúcar, 1% levadura, T ambiente), la muestra 1.1M (miel) presentó un porcentaje de área de etanol menor (99.09% vs 76.84% en el GC-FID, aunque la diferencia en el GC-MS se debe a que este detector de masas no tiene en cuenta el agua ni los azúcares no volátiles, por lo que el etanol aparece más concentrado en el área relativa). La presencia de subproductos adicionales en la miel (picos 3 y 4) refleja la compleja composición

química de este sustrato en comparación con la sacarosa pura, que solo mostró etanol e isopropanol como compuestos mayoritarios.

En conclusión, el análisis por GC-MS de la muestra fermentada con miel confirma que el etanol es el producto mayormente obtenido por la fermentación, acompañado de pequeñas trazas de alcohol isopropílico. Adicionalmente, se detectaron compuestos volátiles propios de la miel (posiblemente ésteres y furanos) que no son un problema para la producción de etanol, pero si hay que incluirlos en el perfil químico del fermentado. La presencia de compuestos como glicerol sugiere que durante la fermentación o el procesamiento de la miel ocurrieron reacciones de degradación de azúcares o estrés osmótico en la levadura.

Referencias bibliográficas.

Association of Official Analytical Chemists. (2019). *Official methods of analysis* (21st ed.). AOAC International.

Harris, D. C. (2020). *Quantitative chemical analysis* (10th ed.). W. H. Freeman.

Ingledew, W. M. (1999). Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast primer. In K. A. Jacques, T. P. Lyons, & D. R. Kelsall (Eds.), *The alcohol textbook* (pp. 49–87). Nottingham University Press.

Lalvin. (2024). *Technical data sheet: Lalvin EC1118 yeast*. Lallemmand Inc.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.

McNair, H. M., Miller, J. M., & Snow, N. H. (2019). *Basic gas chromatography* (3rd ed.). Wiley.

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

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. (2015). *Introduction to spectroscopy* (5th ed.). Cengage Learning.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2018). *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Cengage Learning.

Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2017). *Principles of fermentation technology* (3rd ed.). Butterworth-Heinemann.

Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2007). *Introduction to mass spectrometry: Instrumentation, applications, and strategies for data interpretation* (4th ed.). Wiley.