



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE LA
VAINA DE MEZQUITE PARA FOMENTAR SU
VALOR AGREGADO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

I.B.P. DIANA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Ingeniería de Biorreactores de la Facultad de Ciencias
Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Con financiamiento de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) PROYECTO: 257616
Beca-Tesis del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT): 956734.

“El programa de Maestría en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad
Autónoma de San Luis Potosí, pertenece al Programa Nacional de Posgrados
de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 000588, en el Nivel Consolidado de
Maestría”

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 956734



Fermentación alcohólica de la vaina de mezquite para fomentar su valor
agregado by Diana Hernández Martínez is licensed under a [Creative Commons
Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN BIOPROCESOS

**FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE LA
VAINA DE MEZQUITE PARA FOMENTAR SU
VALOR AGREGADO**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOPROCESOS

PRESENTA:

I.B.P. DIANA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO

SINODALES:

PRESIDENTE:

DRA. LUZ MARÍA TERESITA PAZ MALDONADO

SECRETARIO:

DRA. RUTH ELENA SORIA GUERRA

VOCAL:

DR. MARIANO DE JESÚS GARCÍA SOTO

SAN LUIS POTOSÍ, S. L. P.

JUNIO, 2021

Agradecimientos Académicos

- ✍ A la **Dra. Luz María Teresita Paz Maldonado**, por la confianza, apoyo incondicional, tolerancia, paciencia, por su entusiasmo hacia el proyecto, por estar más que al pendiente a todas las necesidades y por hacer de la estancia en su equipo de trabajo una experiencia inigualable.

- ✍ Al **Dr. Luis Martínez Salgado**, por la confianza y apoyo desde licenciatura para la realización de este proyecto.

- ✍ Al **Dr. Omar González Ortega, Dra. Ruth Elena Soria Guerra, Dr. Mariano de Jesús García Soto, M.C. María del Refugio Pérez Barba, I.A Gloria Sosa Mendoza y la Dra. Ana Silvia Pérez M**, por el apoyo, los comentarios, sugerencias, retroalimentaciones y aportaciones en cada una de las etapas del proyecto.

- ✍ A la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí y a la Facultad de Ciencias Químicas** por haber sido parte del desarrollo del proyecto y de mi crecimiento académico. Así como a todos mis profesores de maestría, por contribuir con todo el aprendizaje obtenido.

- ✍ Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca número 956734 y el financiamiento por parte del proyecto 57616.

Agradecimientos Personales

- ☞ **Agradezco a Dios** por permitirme llegar hasta este punto de mi vida gozando de una buena salud, con una familia unida y amorosa, de una pareja incondicional, con excelentes amigos y personas maravillosas que suman cosas buenas en mi vida.
- ☞ **A mis padres** por su apoyo incondicional y motivación. Por ser mí guía cuando me siento perdida. Gracias a ellos he logrado cumplir cada una de mis metas y sueños hasta el momento.
- ☞ **A mi madre, Ilda** que ha sido mi inspiración, mi soporte, quien me ha forjado y jamás ha permitido que me dé por vencida.
- ☞ **A mi padre, Nivardo** por sus consejos, por siempre estar alerta de mí, cuidarme y velar para que siempre este bien.
- ☞ **A mis hermanos, Edith y Oziel** por escucharme, aconsejarme, por resetear los días malos e intercambiarlos por risas. Por hacer que la distancia duela menos en los días malos, porque verlos y hablar con ellos lo cambia todo para bien.
- ☞ **A mi sobrino, Emiliano** quien inyecta felicidad, energía y alegría a mis días.
- ☞ **A mi novio, Andrés** quien ha estado a mi lado en los días buenos y malos, por su apoyo, comprensión, retroalimentaciones y aportaciones en todo momento durante este trayecto.
- ☞ **A mi compañera y amiga, Susán** por ser mi cómplice, por hacer de este viaje de 2 años y medio más ameno y sencillo. Definitivamente me llevo una gran amistad que fue incondicional en todo momento.

RESUMEN

Las vainas de mezquite son frutos del árbol de mezquite (*Prosopis laevigata*), típico de las regiones áridas y semiáridas de México. En San Luis Potosí, la producción anual varía de 200 a 2200 kg por hectárea siendo un alimento destinado para el ganado y algunas poblaciones rurales, convirtiéndose así en un residuo de baja demanda y las grandes cantidades producidas año tras año se convierten en desecho. En este estudio, se establecieron procesos fermentativos para la producción de bioetanol y cerveza para incrementar el valor agregado de esta materia prima que posee un alto contenido de azúcares (13-50 %).

Para aumentar la producción de bioetanol a partir del extracto de vainas de mezquite, se implementó un diseño Box-Behnken de tres factores que incluye: la concentración inicial de azúcares (20-29 g L⁻¹), la velocidad de agitación (120-200 rpm) y el tipo de cepa de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*: Wild-type 166, SafeAle BE -256™, Safspirit Grain™). La producción de bioetanol alcanzada fue de 7.86 g L⁻¹ con un rendimiento de 0.27 g g⁻¹ y una productividad de 0.22 g L⁻¹ h⁻¹ en condiciones anaeróbicas a 20 °C, pH de 4, concentración inicial de azúcar de 29 g L⁻¹ y 120 rpm utilizando la cepa *Saccharomyces cerevisiae* SafeAle BE-256™.

Para la cerveza artesanal se seleccionó el estilo Blonde Ale fortificado con extracto de vaina de mezquite. Las características organolépticas conforme a los parámetros del Beer Judge Certification Program 2012 fueron: color ámbar, aroma dulce y afrutado. El contenido de alcohol determinado fue de 5 %, pH 4 y 389.73 mg L⁻¹ en contenido polifenólico. Este trabajo presenta una alternativa atractiva para generar productos con mayor valor agregado utilizando vainas de mezquite, para fomentar en un futuro la implementación de pequeñas y medianas empresas en poblaciones rurales.

Palabras clave: bioetanol, Box-Behnken, cerveza artesanal, fermentación alcohólica, *Prosopis laevigata*, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

Mesquite pods –characterized by their high sugar content (13-50 %)- are fruits of the mesquite tree (*Prosopis laevigata*), typical of arid and semiarid regions of Mexico. In San Luis Potosí, the annual production varies from 200 to 2200 kg per hectare, becoming a staple food for small livestock species and some human populations often located in structurally-challenged regions with few alternative forms of employment. Moreover large quantities produced become only waste. In this study, we establish fermentative processes to produce bioethanol and beer-based beverages as worthwhile strategy to take advantage of this carbon source.

A three-factor Box-Behnken design was studied to study the effect of the initial sugar concentration (20-29 g L⁻¹), stirring rate (120-200 rpm) and yeast strain (*Saccharomyces cerevisiae*: Wild-type 166, SafeAle BE-256™, Safspirit Grain™), to increase the production of bioethanol from mesquite pods extract as a fermentative medium. The production of bioethanol was 7.86 g L⁻¹, with a yield of 0.27 g g⁻¹ and a productivity of 0.22 g L⁻¹ h⁻¹ in anaerobic conditions at 20 °C, 29 g L⁻¹ initial sugar concentration, 160 rpm, pH 4, using the strain *Saccharomyces cerevisiae* SafeAle BE-256™.

Blonde Ale was the style craft beer selected and it was supplemented with extracts from mesquite pods. The organoleptic test within the parameters of BJCP 2012 showed a characterized golden color, sweet and fruity aroma ideal for adding different styles of fruity notes such as mesquite. The physical and chemical attributes were: 5 % alcohol content, pH 4, and 389.73 mg L⁻¹ polyphenolic content. This approach presented an attractive alternative to generate products with greater commercial value using mesquite pods, as new opportunities for farmers to help them set up small and medium-sized businesses.

Keywords: bioethanol, Box-Behnken, craft beer, alcoholic fermentation, *Prosopis laevigata*, *Saccharomyces cerevisiae*.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- MARCO TEÓRICO	4
2.1. Fermentación alcohólica	4
2.1.1. Factores que influyen en la producción de bioetanol al utilizar <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.2. Aplicaciones del bioetanol	7
2.2.1. El bioetanol en la industria de las bebidas alcohólicas	7
2.2.2. El bioetanol como combustible	10
2.3. Antecedentes directos	12
III.- JUSTIFICACIÓN	12
IV.- HIPÓTESIS.....	13
V.- OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	13
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
6.1. Recolección de la materia prima y pretratamiento	14
6.2. Molienda y obtención del extracto a partir de vainas de mezquite.....	15
6.3. Cuantificación de los carbohidratos presentes en la harina y extracto de vaina de mezquite.....	15
6.4. Cuantificación del contenido de nitrógeno	16
6.5. Microorganismos utilizados.....	17
6.6. Medios de cultivo	17
6.7. Determinación de una fuente de carbono y nitrógeno	17
6.8. Diseño de experimentos Box-Behnken.....	19
6.9. Traslado de las condiciones a un reactor en lote.....	20
6.10. Cálculos y análisis estadísticos	21
6.10.1. Cuantificación del consumo de carbohidratos solubles y producción de bioetanol	21
6.10.2. Rendimientos del bioetanol y productividad.....	21
6.10.3. Análisis estadístico	22
6.11. Producción de cerveza artesanal.....	22
6.11.1. Análisis sensorial de la cerveza	24
6.11.2. Determinación de polifenoles totales	25

VII. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1. Variación en el contenido de carbohidratos y nitrógeno presentes en la HVM y el EVM	26
7.2. El extracto de vaina de mezquite es la materia prima seleccionada para la producción de bioetanol.....	28
7.3. La cepa <i>S. cerevisiae</i> BE-256™, una baja velocidad de agitación y una concentración de 29 g L ⁻¹ de fuente de carbono favorecen la producción de bioetanol	32
7.4. La concentración de bioetanol obtenida es reproducible a nivel biorreactor	37
7.5. La cerveza artesanal de mezquite posee un porcentaje de alcohol acorde al estilo de cerveza Blonde Ale y califica como excelente con base en el análisis organoléptico	38
7.6. El extracto de vaina de mezquite aumenta el contenido polifenólico en la cerveza Blonde Ale	39
VIII.- CONCLUSIONES.....	40
IX. BIBLIOGRAFÍA	41
X.- ANEXOS.....	47
10.1 Cromatogramas y tiempos de retención para sacarosa, dextrosa, fructosa y etanol por HPLC	47
10.2. Líneas Patrón de etanol, sacarosa, dextrosa y fructosa	48
10.3 Hojas de evaluación para análisis organoléptico	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del mezquite por regiones en México.	3
Figura 2. Variantes A, B y C de vainas de <i>Prosopis leavigata</i> en el Altiplano Potosino de México.	4
Figura 3. Metabolismo fermentativo en las levaduras	7
Figura 4. Proceso de lavado, desinfección, selección y secado de la vaina de mezquite	16
Figura 5. Descripción de los ensayos de fermentación para la producción de bioetanol	20
Figura 6. Proceso de producción de cerveza estilo Blonde Ale y cerveza con EVMA.....	25
Figura 7. Derivados de la vaina de mezquite. a) harina de vaina de mezquite, b) extracto de vaina de mezquite	28
Figura 8. Contenido de carbohidratos en HVM tamizada, EVMA y EVMB	29
Figura 9. Cinéticas de consumo de carbohidratos y producción de bioetanol empleando <i>S. cerevisiae</i> , en medios de fermentación suplementados con 2 fuentes de nitrógeno: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura y un medio control (EVMB o HVM sin fuente de nitrógeno) utilizando como fuente de carbono A) HVM y B) EVMB. Ext= extracto.....	31
Figura 10. Gráficas de superficie de respuesta que representan el contenido de bioetanol en función de las variables evaluadas mediante el DOE Box-Behnken: A) en función del tipo de cepa y agitación B) en función de concentración de azúcares y agitación, y C) en función de concentración de azúcares y tipo de cepa.	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características nutrimentales de tres variantes de vaina de mezquite (<i>Prosopis leavigata</i>) en el Altiplano Potosino, México.....	5
Tabla 2. Contenido de carbohidratos en materias primas utilizadas en procesos biotecnológicos	6
Tabla 3. Efecto de las condiciones de operación y cepa utilizada en la producción de bioetanol.	9
Tabla 4. Enzimas requeridas para la descomposición de carbohidratos presentes en la malta.	10
Tabla 5. Características de cervezas por Familia, estilo Ale.....	11
Tabla 6. Características de cervezas por Familia, estilo Lager.....	12
Tabla 7. Preparación de la HVM, EVMA y EVMB para su análisis por HPLC.....	18
Tabla 8. Diseño experimental Box-Behnken: factores y niveles.....	22
Tabla 9. Diseño experimental Box-Behnken niveles codificados de cada variable.	22
Tabla 10. Formulación de la cerveza estilo Blonde Ale.....	24
Tabla 11. Aspectos considerados para la evaluación de cerveza artesanal de acuerdo con BJCP 2012.....	26
Tabla 12. Clasificación de cerveza de acuerdo con el puntaje obtenido con respecto a BJCP 2012.....	26
Tabla 13. Producción de bioetanol y consumo de carbohidratos solubles al utilizar HVM.	30
Tabla 14. Producción de bioetanol y consumo de carbohidratos solubles al utilizar HVM.	32
Tabla 15. Producción de bioetanol y consumo de carbohidratos solubles al utilizar EVMB.....	32
Tabla 16. Rendimiento y productividad de bioetanol al utilizar HVM.	33
Tabla 17. Rendimiento y productividad de bioetanol al utilizar EVMB	34

Tabla 18. Coeficientes de regresión de las variables independientes no codificadas en la producción de bioetanol a las 24 h.	35
Tabla 19. Coeficientes de regresión de las variables independientes no codificadas en la producción de bioetanol las 36 h.	36
Tabla 20. Producción de bioetanol experimental y predicho utilizando el DOE Box-Behnken. Variables independientes no codificadas: agitación (X_1), cepa de levadura (X_2), concentración inicial de azúcares (X_3).....	37
Tabla 21. Resultado del análisis organoléptico de acuerdo con BJCP	41

I.- INTRODUCCIÓN

El mezquite es un árbol nativo de Asia, África y América, comprende 44 especies distribuidas ampliamente en las regiones áridas y semiáridas (1). En México el mezquite se encuentra en algunos de los estados colindantes a la costa del Pacífico, Golfo de México, regiones del noroeste y centrales del país como San Luis Potosí (Figura 1) (2).

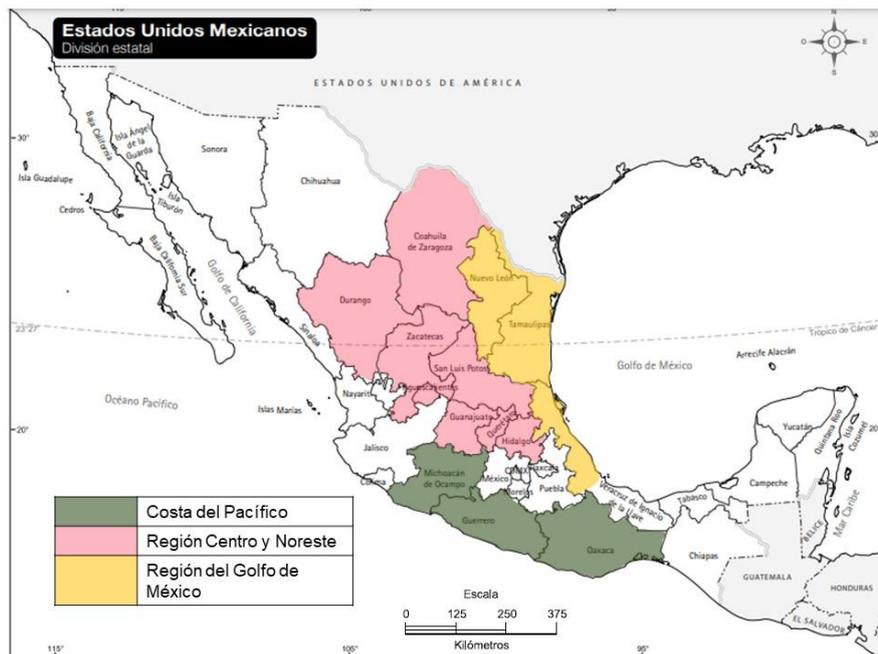


Figura 1. Localización del mezquite por regiones en México.

El mezquite, pertenece al género *Prosopis*, a la familia *Leguminosae (Fabaceae)* y a la subfamilia *Mimosoideae*, constituye uno de los recursos forestales y flora nacional más importantes del norte de México por sus usos como forraje, material de construcción y combustible (3). Las zonas en donde se encuentra proporcionan áreas de recreación humana, refugio de fauna silvestre, fuente de néctar para abejas y otros insectos. La función ecológica del mezquite es muy importante ya que es un excelente fijador de nitrógeno, lo cual mejora la fertilidad del suelo y controla la erosión (4). Además, es viable para la biorremediación de suelos contaminados por metales pesados como el cobre (5).

En San Luis Potosí, México, existen 3 especies: *P. laevigata* (especie más abundante de México y en el estado), *P. glandulosa var. Torreyana* y *P. juliflora* se encuentran en la Zona Media y el Altiplano con una superficie de 193,800 ha. (6).

La zona con mayor distribución y aprovechamiento de este recurso es el Altiplano Potosino (7). La producción anual varía de 200 a 2200 kg por hectárea (8). Los municipios donde se recolectan grandes cantidades de vaina son: Matehuala, Cedral, Villa de Guadalupe, Charcas, Venado, Moctezuma, Aqualulco y Cerritos (9). En el municipio de Matehuala, se ha estimado la producción de siete mil toneladas por año de vaina de mezquite (10).

En el Altiplano Potosino se han identificado tres variantes de la especie *Prosopis leavigata* según el color, tamaño y forma de acuerdo con García-López et al. (7) (Figura 2).

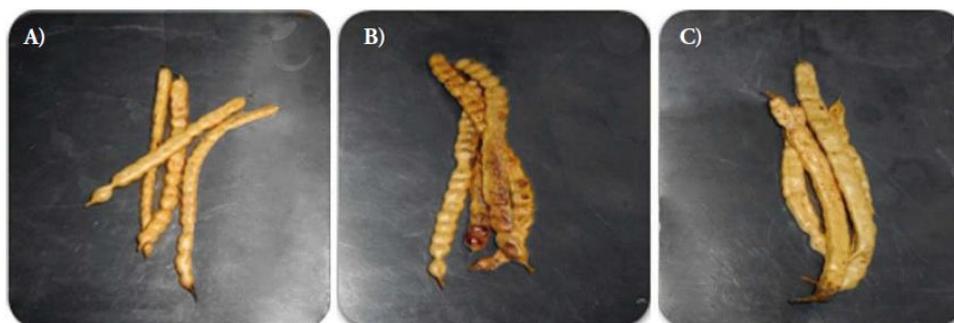


Figura 2. Variantes A, B y C de vainas de *Prosopis leavigata* en el Altiplano Potosino de México.

La variante A tiene una longitud promedio de 13.35 cm, con segmentación poco pronunciada, coloración amarillenta con tonalidades moradas o rojizas, es la variante más común y abundante. La variante B posee una longitud mayor de 14.53 cm, con gran segmentación y coloración amarillenta, en ciertas ocasiones morada o rojiza. La variante C mide 13.05 cm de largo, con pericarpio grueso y poca segmentación, de coloración amarillenta o paja. Respecto a su contenido nutricional no presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a carbohidratos (Tabla 1).

Tabla 1. Características nutrimentales (% MS) de tres variantes de vaina de mezquite (*Prosopis leavigata*) en el Altiplano Potosino, México. Tomado de García-López et al. (7).

Variante	MS	PC	FC	FDN	FDA	Cenizas	Grasa	CHO
A	90.40 ^a	8.84 ^b	17.59 ^a	29.10 ^a	20.19 ^a	4.03 ^b	4.00 ^a	49.20 ^a
B	90.78 ^a	10.28 ^a	16.88 ^a	27.09 ^a	19.92 ^a	4.20 ^a	3.90 ^a	48.10 ^a
C	90.60 ^a	8.14 ^b	15.01 ^b	17.68 ^b	17.68 ^b	3.61 ^c	3.80 ^a	48.90 ^a
EEM	0.17	0.31	0.45	0.38	0.38	0.04	0.02	0.82

MS: materia seca; PC: proteína cruda; FC: fibra cruda; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; CHO: carbohidratos (extracto libre de nitrógeno); EEM: error estándar de la media; ^{a,b,c} Medias con diferente letra en una columna son diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). Los datos representan porcentajes.

Las vainas se consideran como el fruto del mezquite, en promedio pesan 12 g, están formadas por tres partes principales: mesocarpio que conforma el 56 %, endocarpio con el 35 % y semilla con el 9 %. Los frutos de *Prosopis spp.* tienen un alto contenido en carbohidratos (13–50 %), fibra (27–32 %) y proteína (8.1 %) (1).

Los usos como producto alimenticio que se le han dado son: jugo, pinole, queso y piloncillo. En este contexto, la vaina seca se tritura para obtener harina que puede ser mezclada con agua y consumirse inmediatamente, en atole o como harina para repostería (11). El jugo extraído del fruto se mezcla con harina de maíz para formar una bebida conocida como avenate. Y de manera relevante, se ha aprovechado la fermentación de los azúcares del fruto para producir bebidas alcohólicas como son la añapa y la chicha (1).

Los productos que actualmente se generan de la vaina derivan de procesos artesanales en donde no existe un control de las condiciones de operación. Es una materia prima que se utiliza escasamente, en su mayoría se considera desperdicio orgánico, o bien se limita a ser utilizada como alimento de ganado (12).

Algunos estudios han demostrado que la harina de vaina tiene un mayor contenido de carbohidratos solubles en comparación a materias primas que son usualmente utilizadas en procesos biotecnológicos lo que la convierte en una posible fuente sustentable para procesos biológicos como la fermentación alcohólica y así la obtención de bebidas tradicionales como la cerveza o productos como el bioetanol (Tabla 2) (13).

Tabla 2. Contenido de carbohidratos en materias primas utilizadas en procesos biotecnológicos. Modificada de Senatore et al. (14).

Materia prima	Carbohidratos (%)	Almidón (%)
Caña de azúcar	55	--
Maíz	63-69	60-66
Sorgo dulce	65-80	60-75
Trigo	84	58
Remolacha azucarera	66	--
Harina de vaina de mezquite	49	--

II.- MARCO TEÓRICO

2.1. Fermentación alcohólica

Los carbohidratos presentes en la vaina de mezquite (fructosa y sacarosa) pueden ser utilizados en fermentación alcohólica. Este tipo de fermentación parte de materias primas ricas en carbohidratos, que son metabolizados en condiciones anaerobias por levaduras, también por algunas bacterias como *Zymomonas mobilis* y algunos otros microorganismos para convertir azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono. La reacción general es (15):



Los microorganismos comúnmente empleados son levaduras, específicamente *Saccharomyces cerevisiae* por sus rendimientos de etanol que llegan alcanzar hasta 90 %, con respecto a la cantidad de fuente de carbono utilizada y las condiciones de operación. La tolerancia a etanol en promedio de este microorganismo es del 10 % v/v (16), (17). También es capaz de resistir inhibidores químicos como el furfural, ácido vanílico y el hydroximetil furfural, provenientes de hidrolizados lignocelulósicos y melazas (18).

El proceso de fermentación comienza con la descomposición de los azúcares por levaduras para formar moléculas de piruvato. Este proceso es conocido como glucólisis. Durante la glucólisis, una molécula de glucosa produce dos moléculas de ácido pirúvico. Luego el ácido pirúvico se transforma en acetaldehído mediante la enzima piruvato Descarboxilasa y en seguida el acetaldehído se convierte a dos

moléculas de etanol y de dióxido de carbono por medio de la enzima alcohol-deshidrogenasa (Figura 3) (16).

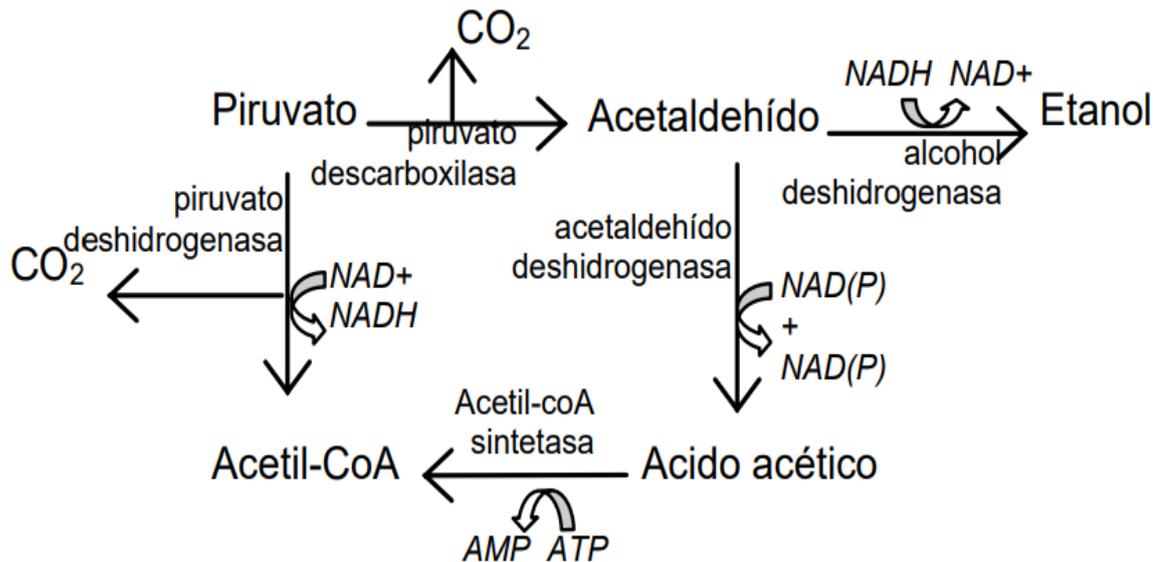


Figura 3. Metabolismo fermentativo en las levaduras. Tomado de Villadsen et al. (19).

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ a partir de 1 g de glucosa (20). Uno de los objetivos del proceso es alcanzar este rendimiento ya que la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos; por lo que el rendimiento con respecto al etanol observado varía entre 90 % y 95 % del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g g⁻¹. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93 % del rendimiento teórico (21).

2.1.1. Factores que influyen en la producción de bioetanol al utilizar *Saccharomyces cerevisiae*

Hay varios factores que influyen en la producción de bioetanol que incluye condiciones operacionales como temperatura, pH y concentración de inóculo, que están directamente relacionados con el tipo de microorganismo y cepa a utilizar. Por otro lado, la agitación, la concentración de azúcares, y el tiempo de

fermentación, favorecen el suministro suficiente de sustrato, su consumo y la permeabilidad de los nutrientes (22).

Como se comentó anteriormente, *S. cerevisiae*, es la levadura más estudiada. El rango de temperatura ideal para la fermentación es entre 20 y 35 °C (23). La concentración inicial de azúcar también se ha considerado un factor importante en la producción de etanol. Se puede obtener una alta productividad y rendimiento de etanol en la fermentación por lotes utilizando una concentración inicial de azúcar alta, lo que requeriría un tiempo de fermentación más prolongado.

Por otro lado el uso de una concentración excesiva de azúcar provocará una tasa de fermentación constante. Esto se debe a que la concentración de azúcar supera la capacidad de absorción de las células microbianas. Generalmente, la tasa máxima de producción de etanol se logra cuando se utilizan azúcares fermentables en una concentración de 150 g L⁻¹ (22).

Durante el proceso de fermentación el pH disminuye y favorece el crecimiento de la levadura, la tasa de fermentación y la formación de subproductos como el glicerol, ácido acético y el ácido fórmico. El rango de pH óptimo de *S. cerevisiae* es 4.0-5.0 (24). La velocidad de agitación confiere homogeneidad al cultivo y permite mejorar la transferencia de masa entre los nutrientes presentes en el medio y el interior de las células. La tasa de agitación comúnmente utilizada para la fermentación es de 150 a 200 rpm (25).

La concentración de inóculo no produce efectos significativos en la concentración final de etanol, pero utilizar concentraciones de 1×10^4 a 1×10^7 células mL⁻¹ favorece la tasa de consumo de azúcar y la productividad (25). Es por ello que el control de las variables de operación es un punto importante para mejorar los rendimientos del etanol, así como la levadura utilizada (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de las condiciones de operación y cepa utilizada en la producción de bioetanol. Modificada de Mohd Azhar et al. (25).

Tipo de Levadura	Materia Prima	Parámetros	CA (g L ⁻¹)	CE (g L ⁻¹)	PE (g L ⁻¹ h ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> RL-11	Café molido	30 °C, 200 rpm, 48 h	195.0	11.7	0.49
<i>S. cerevisiae</i> MTCC 173	Sorgo	30 °C, 120 rpm, 96 h	200.0	68.0	0.94
<i>S. stipitis</i> CBS 6054	Caña gigante	30 °C, 150 rpm, 96 h	33.4	8.2	0.17
<i>S. cerevisiae</i> KL 17	Galactosa y glucosa	30 °C, 200 rpm, 28 h	500.0	96.9	3.46
<i>S. pombe</i> CHFY0201	Almidón de yuca	32 °C, 120 rpm, 66 h	95.0	72.1	1.16
<i>S. cerevisiae</i> CHY1011	Almidón de yuca	32 °C, 120 rpm, 66 h	195.0	89.1	1.35
<i>S. cerevisiae</i> ZU-10	Maíz	30 °C, 180 rpm, 72 h	99.0	41.2	0.57
<i>S. cerevisiae</i> RPRT90	Campanilla	30 °C, 150 rpm, 28 h	72.1	29.0	1.03
<i>S. cerevisiae</i> CHFY0321	Almidón de yuca	32 °C, 120 rpm, 65 h	195.0	89.8	1.38

CA: Concentración de azúcares; CE: Concentración de Etanol; PE: Productividad de Etanol

2.2. Aplicaciones del bioetanol

El bioetanol es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico, su fórmula química es C₂H₅OH, lleva el prefijo "bio" porque se produce mediante la fermentación alcohólica de materias primas ricas en carbohidratos (26).

Los usos más comunes del bioetanol son industriales, domésticos y medicinales. El mercado del bioetanol puede subdividirse en tres, de acuerdo con sus destinos fundamentales como: combustible, uso industrial y bebidas. El uso como combustible representa 61 % de la producción mundial, ya sea para mezclar o reemplazar petróleo y derivados, alrededor de 23 % se destina a la industria procesadora (cosméticos, farmacéuticos, química, entre otras) y el 16 % restante se destina a la industria de bebidas (27).

2.2.1. El bioetanol en la industria de las bebidas alcohólicas

La industria de bebidas alcohólicas consiste en la producción y distribución de bebidas que contienen una concentración igual o superior a 1 % de su volumen de etanol en su composición. Existen dos tipos de bebidas alcohólicas: las fermentadas (vino, cerveza, sidra, etc.), que proceden de frutas o cereales y las destiladas (brandy, tequila, vodka, etc.) que se obtienen al eliminar una parte del

agua contenida en las bebidas fermentadas mediante destilación. En México la cerveza es la bebida alcohólica fermentada más vendida y popular (28).

La cerveza es una bebida fermentada hecha de granos malteados (generalmente cebada), lúpulo, levadura y agua. Tiene una composición compleja, que contiene una gran cantidad de compuestos que varían ampliamente en la naturaleza y en el nivel de concentración. Además del agua y el etanol, los principales componentes de la cerveza son la glucosa y los arabinosilanos (29).

La fuente de carbohidratos en la cerveza son los cereales con alto contenido de almidón, principalmente cebada malteada, pero también se pueden usar otros como el trigo, arroz, maíz, avena, sorgo y jarabes de azúcar.

Durante el proceso de cocción las enzimas presentes y/o activas convierten los carbohidratos de la malta en azúcares solubles (Tabla 4) (29).

Tabla 4. Enzimas requeridas para la descomposición de carbohidratos presentes en la malta (29).

Tipo	Enzima	Sustrato	Función
Amilasas	α -Amilasa	Almidón	Rompe los enlaces $\alpha(1,4)$ glucosídicos.
	β -Amilasa	Almidón y malto-oligosacáridos	Une el penúltimo enlace $\alpha(1,4)$ glucosídico al extremo no reductor.
Carbohidrasas	Dextrina límite	Amilopectina y dextrinas ramificadas.	Une los enlaces $\alpha(1,4)$ glucosídicos.
	α -Glucosidasa	Oligosacáridos y maltosa	Exoenzima que libera glucosa.
	Endo- β -glucanasa	β -Glucano	Libera oligosacáridos de los β -D-glucopiranosil
	Exo- β -glucanasa	Oligosacáridos liberados por endo- β -glucanasas.	Produce glucosa a partir de oligosacáridos de β -glucano
	Endo- β -xilanasas	Arabinosilanos	Une enlaces de β -1,4 xilano
	β -Xilopiranosidasa	Arabinosilanos	Rompe polímeros de xilano
Carboxipeptidasas	α -L-Arabinofuranosidasa	Arabinosilanos	Libera unidades de α -L-arabinofuranosil a partir de pentosanos
	B-Glucano solubilasa	β -Glucano	Rompe los enlaces éster entre proteínas y β -glucanos, liberando β -glucano.

Las levaduras Ale se elevan cerca de la superficie de la cerveza durante la fermentación (fermentación superior, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), la temperatura de fermentación oscila entre 10 y 25 °C. Las levaduras Lager

(*Saccharomyces pastorianus*) se precipitan en el fondo de la cerveza, fermentan más lentamente, y su temperatura óptima esta entre 7-15 °C (30).

El uso de estos tipos de levaduras ha permitido establecer diferentes estilos de acuerdo con el proceso fermentativo (Tabla 5 y 6), que difieren en sabor y diversas características organolépticas (31).

Tabla 5. Características de cervezas por Familia, estilo Ale (32).

Familia y Ejemplo	Color ¹	Aroma y sabor debido a ²		ABV ³	IBU ⁴
		Malta	Lúpulo		
British Extra Special Bitter	Ámbar a cobre profundo	Medio a medio- alto	Medio a medio-alto	4.8 - 5.8	30-45
North American Golden/Blonde Ale	Paja a oro	Tostado a cereal u otros de malta pálida a niveles bajos a medios-bajos.	De medio bajo a medio	4.1 - 5.1	15-25
Belgian And French Belgian Style Dark Strong Ale	Ámbar medio a muy oscuro	Media a alta puede ser rica, cremosa y dulce. Con el suave sabor a malta tostada	Bajo a medio	7.1- 11.2	20-50
Irish Irish-Style Red Ale	Rojo cobre a marrón rojizo	Dulzura de malta a caramelo bajo con una ligera presencia de cebada tostada o malta tostada.	No presente en medio	4.0 - 4.8	20-28
German German-Style Altbier	Cobre a marrón oscuro	Aroma tostado típico de las maltas debe estar presente en niveles bajos con un poco de nuez.	Bajo a medio	4.6 - 5.6	25-52

¹ The American SRM; Standard Reference Method (Método de Referencia Estándar) ² Términos relativos de intensidad de acuerdo con Brewers Association. Estos atributos pueden incluir amargura, sabor, aroma, cuerpo, malta, dulzura u otros. En orden de intensidad creciente, las descripciones utilizadas incluyen: ninguno, muy bajo, bajo, medio-bajo, medio, altura media, elevado, muy alto. ³ ABV: Alcohol By Volumen (Alcohol por Volumen); ⁴ IBU: International Bitterness Unit (Unidades Internacionales de Amargor).

Tabla 6. Características de cervezas por Familia, estilo Lager (32).

Ejemplo	Color ¹	Aroma y sabor debido a ²		ABV ³	IBU ⁴
		Malta	Lúpulo		
Origen Europeo					
European-Style Dark Lager.	Marrón claro a marrón oscuro	Bajo a medio con aromas y sabores a chocolate, tostado y malta	Muy bajo a bajo	4.8-5.3	20-35
Bohemian-Style Pilsener	Paja a oro	Malta ligeramente tostada, ligeramente tostada, a pan tostado	Medio-bajo a medio	4.1-5.1	30-45
Origen Norteamericano					
American-Style Lager.	Paja a oro	Dulzura de la malta es muy baja a baja	No presente a muy bajo	4.1-5.1	5-15
American-Style Dark Lager	Marrón claro a muy oscuro	Bajo aroma y sabor a malta puede incluir bajos niveles de caramelo	Muy bajo a bajo	4.1-5.6	14-24
Otro Origen					
Tropical-Style Light Lager	Paja a oro	La dulzura de la malta está ausente	La dulzura de la malta está ausente	4.1-5.1	9-18

¹ The American SRM: Standard Reference Method (Método de Referencia Estándar). ² Términos relativos de intensidad de acuerdo con Brewers Association. Estos atributos pueden incluir amargura, sabor, aroma, cuerpo, malta, dulzura u otros. En orden de intensidad creciente, las descripciones utilizadas incluyen: ninguno, muy bajo, bajo, medio-bajo, medio, altura media, elevado, muy alto. ³ ABV: Alcohol By Volumen (Alcohol por Volumen). ⁴ IBU: International Bitterness Unit (Unidades Internacionales de Amargor).

2.2.2. El bioetanol como combustible

El bioetanol se considera un combustible oxigenado de combustión limpia debido a su contenido de oxígeno y su alto índice de octanaje (106-110, 12.72 % mayor al de la gasolina), es bastante efectivo al usarse como combustible de mezcla oxigenada, porque su presión de vapor Reid es baja, es decir, sus proporciones no aumentan la volatilidad de las sustancias con las que se suele mezclar como la gasolina, a diferencia del metanol (33).

El bioetanol se puede usar en motores de combustión interna, solo o mezclado con gasolina, dependiendo de su pureza; así, cuando está puro (99.5 %), se puede mezclar, realizando breves modificaciones al motor; si es impuro (95-96 %), no se mezcla (34) y es necesario realizar modificaciones para fortalecer el pistón, la biela, el cigüeñal e incluso los asientos de las válvulas y las válvulas.

Al quemar etanol, se debe aumentar la duración de la inyección (para aumentar el volumen de combustible inyectado) para proporcionar la misma cantidad de energía. Esto implica cambios en el circuito de admisión de combustible y los inyectores para tener un mayor flujo de combustible.

Los motores que funcionan con 100 % de etanol tienen dificultades para arrancar a temperaturas ambiente de -15 °C. Por tanto, el uso de etanol requiere un sistema de calentamiento (35).

El bioetanol en mezclas con gasolina se utiliza en concentraciones de 5 o 10 % (v/v). Otra alternativa para el uso del bioetanol como combustible es transformarlo mediante el proceso Hüls de producción de éteres terbutílicos (36) y puede ser utilizado como aditivo de la gasolina (37).

Las ventajas del uso de bioetanol como combustible se describen a continuación (38).

- Tiene un mayor índice de octano, lo que evita el golpeteo del motor, la ignición temprana y conduce a un alto valor antidetonante.
- Su mayor contenido de oxígeno permite una combustión más limpia y reduce las emisiones de hollín, monóxido de carbono e hidratos de carbono en comparación con los combustibles fósiles.
- Ayuda a reducir hasta un 80 % las emisiones de CO₂ del ciclo de vida en comparación con los combustibles fósiles.
- Tiene límites de inflamabilidad más amplios, mayor velocidad de llama, mayor calor de vaporización y menor tiempo de ignición, lo que mejora la combustión de combustible en comparación con los combustibles fósiles.
- Es biodegradable y no contiene compuestos aromáticos, olefinas y diolefina (33).

2.3. Antecedentes directos

En estudios previos se determinó y caracterizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) que el contenido total de carbohidratos en la harina de vaina de mezquite (HVM) era de 56 %, de este porcentaje, el 86 % corresponde a sacarosa y el 14 % restante a fructosa (39).

Además, se realizó una fermentación por 120 h por triplicado empleando medio Mz (harina de vaina de mezquite/H₂O; en una relación 1:4 p/v) el cual se suplementó con (NH₄)₂SO₄ como fuente de nitrógeno para la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Safspirit Grain™ (FERMENTIS, Francia), con el objetivo de utilizar una materia prima inusual en procesos fermentativos (HVM) y así evaluar la producción de bioetanol a nivel matraz mediante una fermentación anaerobia.

Se establecieron cinéticas de consumo de sustrato y producción de bioetanol. La concentración de carbohidratos iniciales fue de 22.33 g L⁻¹. La presencia de bioetanol se detectó desde las 24 h. A las 30 h alcanzó su máxima producción de 7.59 g L⁻¹ con un rendimiento de 0.40 g etOH g azúcar⁻¹ y productividad de 0.25 g etOH h⁻¹ (39).

Se determinó que la HVM contiene azúcares fermentables que son asimilables por la levadura *S. cerevisiae*, generando la posibilidad de emplearla en futuros procesos fermentativos para la obtención de productos de valor agregado.

III.- JUSTIFICACIÓN

La vaina de mezquite no suele ser aprovechada como biomasa debido al desconocimiento de su uso y/o aplicaciones que pudiera tener con respecto a su contenido nutricional, por lo que las grandes cantidades producidas se convierten solo en desechos. Lo anterior impulsa a buscar opciones de aprovechamiento de la vaina, recurso abundante en la región, con un alto contenido de azúcares solubles, para utilizarla como materia prima en procesos de fermentación alcohólica y de esta manera obtener productos de alto valor agregado como el bioetanol y cerveza artesanal.

IV.- HIPÓTESIS

Los azúcares fermentables disponibles en las materias primas derivadas de la vaina de mezquite como la harina o el extracto, permiten obtener productos de alto valor agregado como el bioetanol y una bebida alcohólica con características organolépticas distintivas a las generadas en el mercado.

V.- OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo General

Fomentar el aprovechamiento del uso de vaina de mezquite en procesos fermentativos para la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza artesanal y productos bioenergéticos como el bioetanol.

Objetivos Específicos:

- Establecer el proceso de pretratamiento de la vaina de mezquite para generar sustratos necesarios para los procesos fermentativos.
- Determinar del contenido de nitrógeno y carbohidratos totales en la harina de vaina de mezquite (HVM) y en el extracto de vaina de mezquite (EVM).
- Seleccionar la materia prima HVM o EVM con base en el rendimiento de bioetanol.
- Establecer las condiciones operacionales como agitación, concentración de azúcares iniciales y tipo de cepa que permitan aumentar los rendimientos en los ensayos de fermentación.
- Establecer el comportamiento cinético de *S. cerevisiae* en un cultivo en lote bajo diferentes condiciones de operación.
- Trasladar el cultivo a nivel biorreactor, determinar rendimiento y producción de bioetanol bajo condiciones controladas.
- Producir cerveza estilo Blonde Ale artesanal adicionada con EVM con características organolépticas distintivas a las generadas en el mercado.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Recolección de la materia prima y pretratamiento

La recolección de vainas de mezquite se realizó en el municipio de Matehuala, S.L.P., municipio seleccionado con base en la evidencia histórica y arqueobotánica de una cultura de uso del mezquite y abundancia del recurso durante el verano de 2019 y 2020 (7). En julio de 2020 se hizo una tercera recolección en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., vainas que fueron destinadas exclusivamente al proceso de elaboración de cerveza.

Todas las vainas recolectadas llevaron el mismo proceso: un lavado y desinfección con cloro al 2 %. Un secado de las vainas por 3 días al sol para eliminar el exceso de agua, posteriormente se seleccionaron, descartando las vainas infectadas o perforadas.

Una vez seleccionadas se realizó un segundo proceso de secado por 6 h a 60 °C en un horno a gas de 8 bandejas FTT-240G (Tedesco, Brasil) (Figura 4). Las vainas secas se separaron en dos partes iguales para su posterior uso.



Figura 4. Proceso de lavado, desinfección, selección y secado de la vaina de mezquite.

6.2. Molienda y obtención del extracto a partir de vainas de mezquite

La primera parte de vainas secas se introdujeron a una pulverizadora K20 (Micron, México). La harina obtenida se pasó por un tamiz de acero inoxidable No. 30 (Fisher Scientific, EUA) con un tamaño de poro de 600 μm para descartar partículas de tamaño indeseable.

La harina tamizada fue empaquetada inmediatamente al alto vacío después de su procesamiento (Koch Ultravac, EUA) para ser utilizada más adelante como fuente de carbono en medio de fermentación.

Para la obtención del extracto de vaina de mezquite (EVM) se trituró la segunda parte de las vainas secas en un molino R-14 (Cabrera, México) después, la harina obtenida fue disuelta en agua utilizando una relación 1:4 p/v, se hirvieron durante 2.5 h, tiempo en el que alcanzó una concentración de 18 °Bx. Por otro lado, el triturado húmedo resultante se enjuagó adicionando agua para recuperar residuos de azúcares solubles, se dejó hervir hasta alcanzar 10 °Bx.

Al extracto con la concentración de 18 °Bx se le nombró como EVMB, mismo que fue destinado para los ensayos en la producción de bioetanol, mientras que el de 10 °Bx indicado como EVMA se empleó para la producción de cerveza.

6.3. Cuantificación de los carbohidratos presentes en la harina y extracto de vaina de mezquite

Los azúcares solubles presentes en la harina y el extracto de vaina de mezquite se determinaron por HPLC 1260 infinity (Agilent Technologies, EUA). Se utilizó una columna HC-75 compatible con solventes orgánicos y su mecanismo de separación fue por exclusión iónica. La columna HC-75 para HPLC por intercambio catiónico es compatible con detectores de índice de refracción (RI) y UV-visible. La temperatura de la columna empleada fue de 60 °C a una presión de 124 kPa. Como fase móvil se utilizó agua desionizada previamente filtrada. La preparación de cada muestra dependió de su estado líquido o sólido (Tabla 7).

Tabla 7. Preparación de la HVM, EVMA y EVMB para su análisis por HPLC.

Muestra		Preparación	Dilución
HVM	Extracto de Vaina de Mezquite	Solución acuosa de HVM tamizada a una concentración de 1 g mL ⁻¹ . Mezclar hasta disolver. Centrifugar por 5 min a 13000 rpm y recuperar sobrenadante.	1:100
EVMA y EVMB	Extracto de Vaina de Mezquite A y B	1.5 mL de muestra en un tubo eppendorf. Centrifugar por 5 min a 13000 rpm y recuperar sobrenadante.	1:50

Para la caracterización de los azúcares presentes en las muestras, se tomó en cuenta los reportes previos de detección de azúcares y de etanol (40) para identificar los tiempos de retención (Anexo 11.1) de moléculas como la sacarosa, dextrosa, fructosa y etanol. Además de realizar líneas patrón para cada molécula: sacarosa (0.005, 0.05, 0.5, 1 mg mL⁻¹; Sigma, EUA), dextrosa (0.005, 0.05, 0.5 mg mL⁻¹; Reproquifin, México) y fructosa (0.01, 0.1, 0.3 mg mL⁻¹; Sigma, EUA).

6.4. Cuantificación del contenido de nitrógeno

En un tubo de Kjeldahl se agregó 0.5 g de HVM sin tamizar o 1 mL para HVMB, 1 g de catalizador para proteínas (91 % K₂SO₄; 9 % CuSO₄·5H₂O, Sigma, EUA) y 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Jalmek, México), posteriormente el tubo se introdujo en el digestor Kjeldahl TE-008/50-04 (Tecnal, Brasil) por aproximadamente 1 h a 250 °C hasta obtener un cambio de coloración de café oscuro a verde/amarillo claro. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, durante este tiempo se mantuvieron en el digestor.

Para la destilación se empleó el micro destilador Kjeldahl DEK-1 (Sev-Prendo, México), previamente precalentado y conectado al condensador. Se instaló el tubo con la muestra, se colocó un matraz de 125 mL en la salida de la manguera de destilación, el matraz contenía 5 mL de solución de ácido bórico saturada y 2 gotas de indicador de rojo de metilo. Además se agregó 10 mL de NaOH (Jalmek, México) al 60 % en el dosificador del equipo. El punto final de la destilación fue al recuperar un volumen mínimo de 50 mL con una coloración verde en el destilado.

El contenido se tituló empleando HCl 0.1 N (Jalmek, México), en agitación, hasta obtener un cambio de coloración a rosa o violeta.

6.5. Microorganismos utilizados

Se utilizaron cuatro tipos de cepas de *S. cerevisiae*: SafeAle BE-256™, Safspirit Grain™, Safale US-05™ (estas tres provenientes Fermentis, Francia) y Wild-type 166 (Stock del Laboratorio de Ingeniería de Biorreactores, UASLP).

6.6. Medios de cultivo

La fuente de carbono presente en el medio de cultivo se obtuvo de la materia prima procesada: HVM o EVM; las concentraciones utilizadas de sustrato fueron: 15, 20, 25 y 29 g L⁻¹, de acuerdo con los ensayos realizados para la determinación de la composición de medio apropiada, así como para la determinación de las mejores condiciones de operación utilizando un diseño experimental (DOE) Box-Behnken (BB). Todos los medios, matraces y biorreactor utilizados se esterilizaron previamente en autoclave a 121 °C, 103 kPa durante 15 min.

El número de células de levadura utilizadas para los cultivos fue de 10⁶ células mL⁻¹; para ello se utilizó un cultivo de *S. cerevisiae* Wild-type 166, se tomó una asada de la caja de cultivo y se transfirió a 8 mL de caldo YPD (10 g L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g L⁻¹ de triptona, IBI Scientific, EUA; 20 g L⁻¹ de dextrosa, Sigma, EUA) en tubos falcon de 15 mL para su crecimiento y activación durante 12 horas, 25 °C, 120 rpm. Posteriormente se utilizó como pre-inóculo. Las levaduras liofilizadas *S. cerevisiae* BE-256™ y Safspirit Grain™ fueron rehidratadas antes de la fermentación, utilizando 10 mL de medio de cultivo en condiciones anaeróbicas durante 20 min y a 25 °C.

6.7. Determinación de una fuente de carbono y nitrógeno

En el primer ensayo se realizó en 100 mL de volumen de trabajo en matraces de 250 mL, se utilizaron 6 grupos experimentales (Figura 5), grupo 1 y 2: control (HVM o EVM); grupo 3 y 4: HVM o EVM fortificado con una fuente orgánica de nitrógeno (extracto de levadura al 10 % p/v) y grupo 3: HVM o EVM fortificada con una fuente inorgánica de nitrógeno (sulfato de amonio al 0.2 % p/v, Golden Bell, México). El pH inicial del proceso fermentativo fue de 4 y un tiempo de fermentación de 48 h. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

ENSAYO 1. SELECCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO NIVEL: MATRAZ

Volumen: 100 mL

CONDICIONES

Proveedor: 30°C, 5x10⁶ g/ml, pH 4

Literatura: 150 rpm, 48 h, 150 g/L
Mohd Azhar, (2017)

Preparación Medio de cultivo a partir de harina de vaina tamizada y extracto de mezquite



NOTA: Para 1 L se requieren 150 g de azúcares por lo tanto

	Azúcares Totales %*	Para 1 L H ₂ O	Para 100 mL H ₂ O
HVM tamizada	38.26	392.05 g	39.20 g
EVMB	13.44	433.02 mL	43.3 mL

* De acuerdo a los resultados obtenidos en las determinación de carbohidratos totales por HPLC

Muestras	
T0	Muestra al inicio
Día 1	Cada 3 h por 12 h
Día 2	Cada 3 h por 12 h



Análisis estadístico: ANOVA, Prueba de Tukey (p ≤ 0.05). STATISTICA 10.



ENSAYO 2. DISEÑO DE EXPERIMENTO NIVEL: MATRAZ

- MEDIO
- DISEÑO DE EXPERIMENTO (DOE)

Volumen: 100 mL



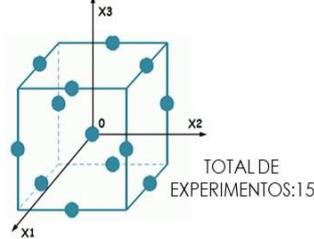
Con HVM*



Con EVMB*

*Medio con la fuente de nitrógeno seleccionada en el ensayo 1.

Box-Behnken 3³



- Variables independientes para el DOE
- Selección de 3 condiciones operacionales de acuerdo a los resultados del ensayo 1

- CONDICIONES OPERACIONALES



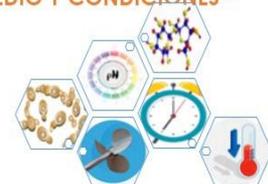
ENAYO 3. TRASLADO NIVEL: BIORREACTOR

Volumen: 500 mL



Bioreactor Applikon, EUA.

MEDIO Y CONDICIONES**



**Medio con la fuente de carbón y condiciones seleccionadas a partir del ensayo 2.

Figura 5. Descripción de los ensayos de fermentación para la producción de bioetanol.

6.8. Diseño de experimentos Box-Behnken

Se realizó un diseño experimental Box-Behnken de tres factores a tres niveles que consistió en 15 experimentos (Tabla 8 y 9). Este diseño es adecuado para evaluar el efecto de variables sobre una respuesta con base en el análisis de superficies de respuesta y modelos polinomiales de segundo orden y tiene la ventaja de disminuir el número de experimentos a realizar. El diseño consta de tres puntos centrales y un conjunto de puntos que se encuentran en los puntos medios de cada borde del cubo multidimensional que define la región de interés. El ajuste a un modelo de segundo orden tiene la siguiente forma:

$$Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1^2 + a_5X_2^2 + a_6X_3^2 + a_7X_1X_2 + a_8X_1X_3 + a_9X_2X_3$$

donde Y es la respuesta seleccionada, $a_0 - a_9$ son los coeficientes de regresión y X_1, X_2, X_3 son los factores o variables estudiados. El diseño experimental Box-Behnken es semejante al diseño ortogonal. Por lo tanto, los niveles de los factores están espaciados uniformemente y codificados para configuraciones bajas, medias y altas, como -1, 0 y +1.

Este diseño permitió establecer las condiciones del proceso fermentativo para su traslado a nivel biorreactor. Para ello, se estudió el efecto de las variables: concentración inicial de azúcar (20-29 g L⁻¹), velocidad de agitación (120-200 rpm) y tipo de cepa de levadura utilizada durante el proceso de producción de bioetanol.

El medio de cultivo utilizó como fuente de carbono el EVMB, suplementado con sulfato de amonio. Las fermentaciones se realizaron durante 48 h, en matraces de 250 mL con un volumen de 100 mL de medio de cultivo a 20 °C y pH 4. Se tomaron muestras a las 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48 h. El diseño experimental y el análisis estadístico se establecieron utilizando el software MinitabTM v16.0 (Minitab Inc., EUA).

Tabla 8. Diseño experimental Box-Behnken: factores y niveles

Factor	Símbolo	Niveles codificados		
		-1	0	+1
Agitación (rpm)	X ₁	120	160	200
Cepa de <i>S. cerevisiae</i>	X ₂	Wild Type 166	BE-256™	Safspirit Grain™
Sustrato (g L ⁻¹)	X ₃	20	25	29

Tabla 9. Diseño experimental Box-Behnken niveles codificados de cada variable.

Corrida	Variables Independientes		
	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	0	-1
2	-1	1	0
3	-1	-1	0
4	-1	0	1
5	0	1	-1
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	-1	-1
9	0	0	0
10	0	-1	1
11	0	1	1
12	1	0	-1
13	1	1	0
14	1	-1	0
15	1	0	1

6.9. Traslado de las condiciones a un reactor en lote

Con base en las condiciones operacionales establecidas utilizando la metodología de superficie de respuesta (RSM) del ensayo anterior, se realizó el traslado del proceso a nivel biorreactor. Las fermentaciones se realizaron en 0.3 L de medio de fermentación utilizando como fuente de carbono el EVMB.

Se utilizó un biorreactor de 1 L (Applikon, EUA) y el sistema de control PID adaptativo “ez-control™” (DeltaV, EUA). Las condiciones fueron: temperatura 20 °C, pH 4 y agitación 120 rpm. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24 y 36 h para evaluar la producción de bioetanol y el consumo de carbohidratos solubles.

6.10. Cálculos y análisis estadísticos

6.10.1. Cuantificación del consumo de carbohidratos solubles y producción de bioetanol

A partir de las muestras recuperadas para los tiempos 0, 12, 24 y 36 h en todos los ensayos de fermentación realizados, estas se analizaron por HPLC bajo las mismas condiciones anteriormente descritas para la determinación de carbohidratos en la HVM y EVM.

Cada muestra se centrifugó durante 5 minutos a 13000 rpm; el sobrenadante fue recuperado y se diluyó con agua desionizada previamente filtrada que se utilizó como solvente en una proporción de 1:50 para las muestras recolectas de 0 a 12 h, después de las 12 h la dilución fue de 1:20. Fue necesario la realización de 4 líneas patrón (como disolvente se empleó agua desionizada previamente filtrada): (0.01, 0.05, 0.5, 1, 1.2 mg mL⁻¹) de etanol (Golden Bell, México), sacarosa (0.005, 0.05, 0.5, 1 mg mL⁻¹), dextrosa (0.005, 0.05, 0.5 mg mL⁻¹) y fructosa (0.01, 0.1, 0.3 mg mL⁻¹) y de esta manera determinar la concentración de estos compuestos.

6.10.2. Rendimientos del bioetanol y productividad.

El rendimiento aparente de formación de etanol con respecto de los carbohidratos (41), se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Y \frac{p}{s} = \frac{g \text{ ETOH}}{g \text{ CH}}$$

Donde: $Y \frac{p}{s}$ es el rendimiento de producto/sustrato; $g \text{ ETOH}$ son los gramos de etanol producidos y $g \text{ CH}$ son los gramos de carbohidratos consumidos durante la fermentación.

La productividad fue el cociente entre la producción de bioetanol (g L⁻¹) y el tiempo de fermentación (h).

6.10.3. Análisis estadístico

Los datos de producción de etanol, consumo de sustrato y productividad fueron evaluados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) utilizando el software STATISTICA v10 (StatSoft, EUA).

6.11. Producción de cerveza artesanal

Se eligió un estilo Blonde Ale para la producción de cerveza artesanal por su característico color dorado, su perfil balanceado entre malta y lúpulo. Un aroma dulce y frutal ideal para adicionar diferentes estilos de notas frutales como las del mezquite (Tabla 10) (42).

Tabla 10. Formulación de la cerveza estilo Blonde Ale (43).

Maceración: tiempo 1 h a 67 °C				Hervido: tiempo 1 h			
Malta, otros granos e ingredientes	Cantidad (kg)		Variedad de lúpulo	Alfa ácidos (AA)	Cantidad (g)		
	19 L	4 L			19 L	4 L	
Malta Base 2H	4.1	0.86	Willamette	5 %	28	5.90	
Malta Caramelo	0.15	0.0315					
EVM	Proporción 1:10 de acuerdo con los kg totales de Malta						
Fermentación					Embotellado		
Cepa de Levadura	Cantidad (g)		Temperatura	Tiempo	Densidad	Carbonatación	
	19 L	4L					
Safale US-05™	11.5 g	2.42	25 °C	14 días	1.011 $\frac{kg}{m^3}$	2.5 vols. de CO ₂ , 14 días a 25 °C.	

Para la elaboración de la cerveza (Figura 6), los azúcares fueron extraídos mediante maceración de la malta previamente molida al ponerla en contacto con agua a 60 °C por una hora. El lixiviado obtenido se calentó y al alcanzar el punto de ebullición se agregó 4 g de lúpulo (Vic Secret, Australia), se hirvió por 60 min, al finalizar, el sistema se enfrió con apoyo de un serpentín de cobre hasta alcanzar una temperatura de 20-25 °C, el mosto se pasó a un fermentador de 20 L al que se le adicionó la levadura Safale US-05™ a este proceso se le conoce como fermentación primaria, tiene una duración de 15 días a temperatura ambiente, se realiza en ausencia de luz.



Figura 6. Proceso de producción de cerveza estilo Blonde Ale y Blonde Ale con EVMA.

La carbonatación se hizo de forma natural con el CO₂ que se genera en una segunda fermentación durante 15 días a temperatura ambiente y poca iluminación. Para esto, se añadieron 6 g azúcar L⁻¹ al fermentador, se mezcló para homogenizar, se dejó reposar por 20 min, finalmente el fermentado se trasladó a botellas de vidrio ámbar de 355 mL y se sellaron con corcholatas utilizando una máquina selladora manual (Homebrewers Outpost, EUA).

6.11.1. Análisis sensorial de la cerveza

Las cervezas Blonde Ale con y sin extracto de mezquite fueron evaluadas utilizando los parámetros del “Beer Judge Certification Program” 2012 por panelistas capacitados de la empresa “La Lendendaria”, San Luis Potosí. La evaluación consiste en 5 aspectos que equivalen a puntajes como se muestra en la Tabla 11, el máximo puntaje acumulado es de 50 puntos. Dependiendo de los puntos recolectados es la forma en la que se califica la cerveza (Tabla 12).

Tabla 11. Aspectos considerados para la evaluación de cerveza artesanal de acuerdo con BJCP 2012.

Aspecto	Características específicas	Puntaje máximo
Aroma	Malta, lúpulo, los ésteres y otros aromáticos	12
Apariencia	Color, turbidez, espuma.	3
Sabor	Malta, lúpulo, características de fermentación, balance, final/retrogusto	20
Sensaciones en boca	Cuerpo, carbonatación, calentamiento, cremosidad, astringencia.	5
Impresión General	Placer general	10

Tabla 12. Clasificación de cerveza de acuerdo con el puntaje obtenido con respecto al BJCP 2012.

Rangos de Puntos	Clasificación	Comentarios
45-50	Sobresaliente	Ejemplo de clase mundial del estilo
38-44	Excelente	Ejemplifica el estilo bien, requiere afinamientos menores
30-37	Muy buena	Generalmente dentro del estilo, algunas fallas menores
21-29	Buena	Pérdida de marcas del estilo y fallas menores
14-20	Regular	Sabores extraños o deficiencias mayores del estilo
0-13	Problemática	Sabores y aromas extraños mayores son dominantes

6.11.2. Determinación de polifenoles totales

El contenido de polifenoles en cerveza se asocia a un menor riesgo de accidente cardiovascular y disminución de la mortalidad. La fuente principal de polifenoles proviene de la malta (70-80 %) y el lúpulo (30 %) (44). Para determinar si el EVMA aumenta el contenido de polifenoles en cerveza, se cuantificaron estos en los dos tipos de cerveza (Blonde Ale y Blonde Ale con EVMA). El método utilizado fue el de Folin-Ciocalteu. Los estándares empleados fueron: 0, 50, 100, 150, 200 y 250 mg L⁻¹ de solución de ácido gálico (Sigma, EUA) en metanol-agua 50:50 v/v (Golden Bell, México).

Se tomaron 25 µL de cada muestra y estándar (1:10 v/v) se agregó 250 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma, EUA), 2.25 mL de agua miliQ previamente filtrada y esterilizada, así como 2 mL Na₂CO₃ 1 M (Golden Bell, México). Las soluciones se calentaron a 45 °C durante 15 minutos y se determinó la absorbancia a 750 nm en un lector de microplaca iMARK (Bio-Rad, EUA). El contenido fenólico total se representa en equivalentes de ácido gálico (mg mL⁻¹).

VII. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Variación en el contenido de carbohidratos y nitrógeno presentes en la HVM y el EVM

Se trabajó específicamente con 3 derivados de la vaina de mezquite (Figura 7). La concentración de carbohidratos fue de 7 % y 13.44 % para el EVM A y B, respectivamente; con respecto de la HVM sin tamizar se obtuvo una concentración de azúcares de 11.4 % y para la HVM tamizada aumentó 3.4 veces (38.26 %). En trabajos anteriores, la concentración de carbohidratos determinada fue del 56 % (39). García-López et al. (7) evaluaron la composición química de 3 variantes de vainas de *Prosopis leavigata* del Altiplano Potosino, determinando que su contenido en carbohidratos varió de 48.10 a 49.20 %.

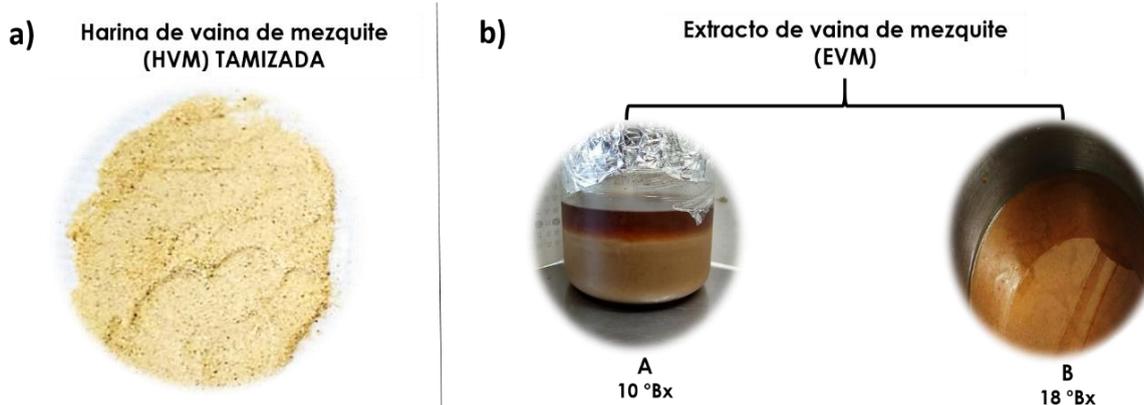


Figura 7. Derivados de la vaina de mezquite. a) harina de vaina de mezquite, b) extracto de vaina de mezquite.

La variación de 22 y 32 % en el contenido de carbohidratos en este trabajo con lo reportado por García-López et al. (7) y lo obtenido en la tesis de licenciatura Hernández (39) sugiere que el contenido de carbohidratos es función del lugar de recolección y como lo reporta Ruiz (9) se ve afectado por el tipo de suelo y las condiciones de crecimiento del árbol. Además Cerón et al. (12) indican que el grado de madurez influye en las características fisicoquímicas del derivado en polvo de la vaina, observando valores más altos de proteínas en un estado verde y una cantidad más alta de carbohidratos en vainas maduras.

Los azúcares identificados para los derivados de vaina de mezquite fueron: sacarosa en mayor proporción (en un rango de 76-93 %), seguido de fructosa (7-9 %) y en el caso del EVMA la presencia de dextrosa (23 %) (Figura 8).

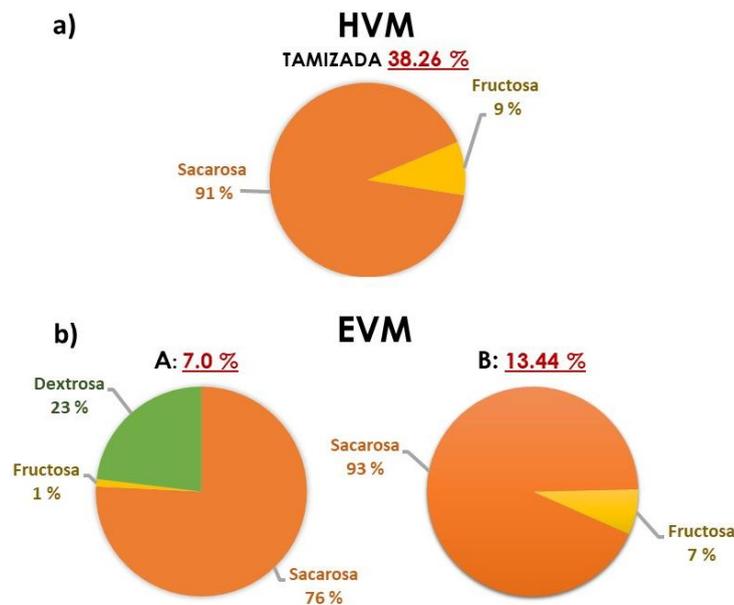


Figura 8. Contenido de carbohidratos en HVM tamizada, EVMA y EVMB.

El perfil de azúcares de las vainas utilizadas fue similar al indicado por Peña et al. (45). Sin embargo, existen reportes en *Prosopis alba*, donde se ha encontrado la presencia de xilosa (46).

A partir de estos resultados se seleccionó la HVM tamizada y el EVMB por su mayor contenido de carbohidratos como materias primas para la producción de bioetanol. El EVMA fue utilizado como aditivo en la producción de cerveza de mezquite estilo Blonde Ale.

El contenido de nitrógeno observado en la HVM sin tamizar fue 5.5 veces mayor que en el EVMB; de manera que el contenido de nitrógeno en la HVM proveniente de *P. leavigata* es 1.17 veces mayor al rango reportado por García-López et al. (7), para la misma especie y 1.48 veces mayor para otras especies (Tabla 13) (46).

Estos resultados sugieren que durante el tratamiento térmico utilizado para la obtención del EVMB únicamente solubilizó el 2.18 % del porcentaje total de nitrógeno reportado para la HVM en este trabajo.

Tabla 13. Contenido de nitrógeno en la HVM sin tamizar y EVMB obtenidos de forma experimental y los descritos en la literatura para la vaina de mezquite.

Materia Prima	Contenido de nitrógeno
HVM sin tamizar*	12.0 %
EVMB*	2.18 %
Vaina de Mezquite*	8.14-10.28 % (7)
Vaina de Mezquite ^{††}	6.0 a 8.11 % (46)

* Especie *Prosopis leavigata*; ^{††} Otras Especies del género *Prosopis*

Ingledeew (47) reportó que si el nitrógeno amino libre está por debajo de 150 mg L⁻¹ en los cereales utilizados como materia prima, conduce a fermentaciones lentas o incluso inconclusas. Concluyó que la mayoría de los cereales utilizados en la producción de etanol son deficientes en la fuente de nitrógeno. Por ello, se recomienda adicionar esta fuente como suplemento para remediar esta deficiencia.

7.2. El extracto de vaina de mezquite es la materia prima seleccionada para la producción de bioetanol

Las cinéticas de consumo de sustrato y de producción de bioetanol se muestran en las figuras 9A y 9B, se observa que el consumo de azúcares se llevó a cabo en las primeras 24 h mientras que la generación de etanol se realiza a partir de las 12 h. La producción de bioetanol es similar en los cultivos utilizando la HVM y el EVM con una tasa promedio de producción de 3.20 g L⁻¹, lo anterior con base en ANOVA utilizando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95 %.

Se propone una relación directamente proporcional entre la generación de biomasa con respecto del consumo de sustrato; mientras que la producción de bioetanol corresponde a una cinética de formación de producto no asociada al crecimiento celular, al asumir que el sustrato es únicamente destinado al crecimiento celular en la fase exponencial, y una vez alcanzada la fase exponencial tardía (12 h) el etanol se acumula. Los resultados de las gráficas descritas están resumidos en las Tablas 14 y 15.

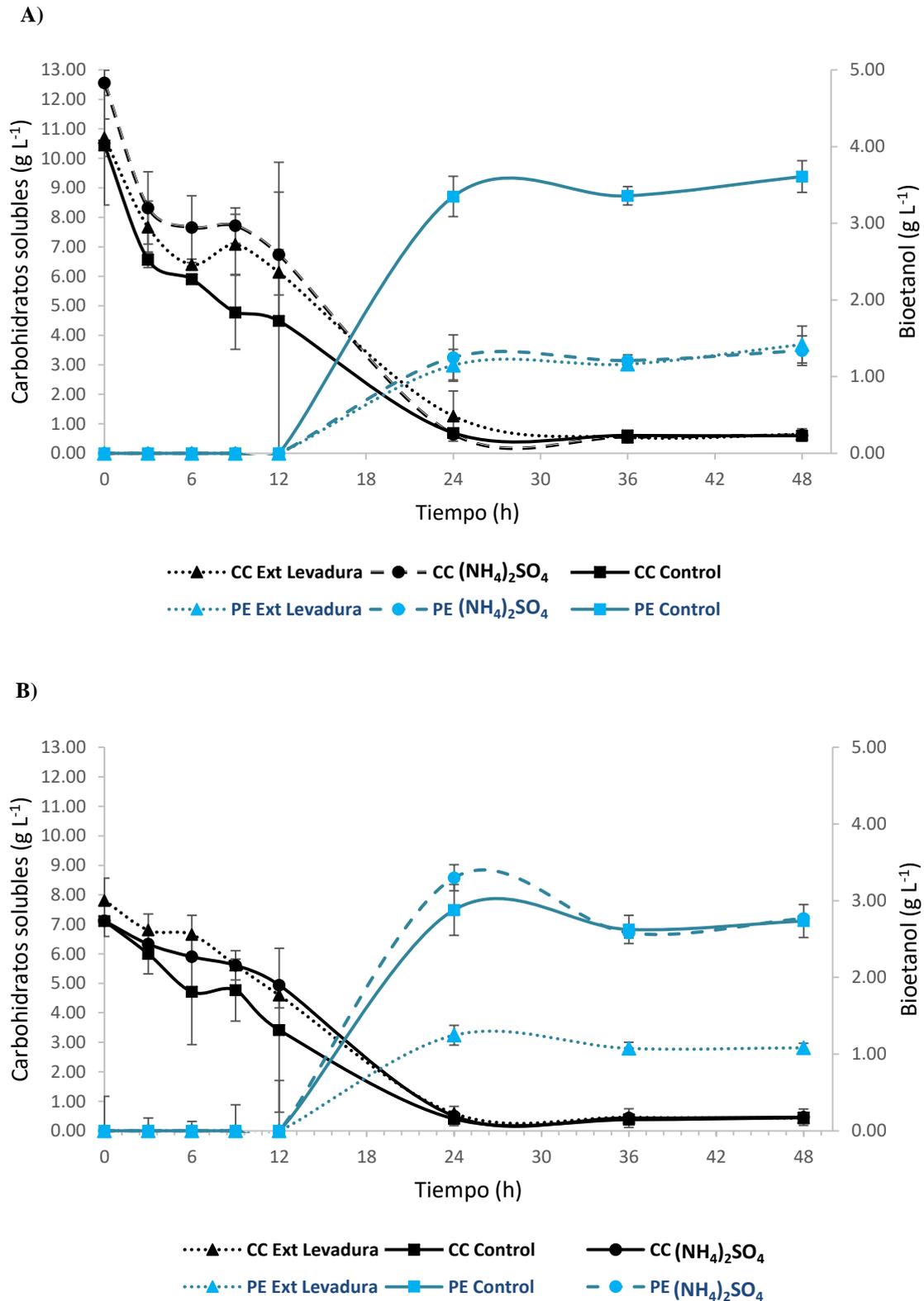


Figura 9. Cinéticas de consumo de carbohidratos (CC) y producción de bioetanol (PE) empleando *S. cerevisiae*, en medios de fermentación suplementados con 2 fuentes de nitrógeno: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extracto de levadura y un medio control (EVMB o HVM sin fuente de nitrógeno) utilizando como fuente de carbono A) HVM y B) EVMB. Ext= extracto.

Tabla 14. Producción de bioetanol y consumo de carbohidratos solubles al utilizar HVM.

Tiempo (h)	Carbohidratos solubles (g L ⁻¹)			Bioetanol (g L ⁻¹)		
	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a levadura	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a levadura
0	10.44 ± 2.02	12.56 ± 0.43	10.70 ± 0.64	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
3	6.56 ± 0.26	8.32 ± 1.23	7.67 ± 0.88	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
6	5.91 ± 0.07	7.66 ± 1.08	6.40 ± 0.07	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
9	4.78 ± 1.26	7.72 ± 0.60	7.08 ± 1.02	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
12	4.49 ± 5.38	6.74 ± 2.12	6.14 ± 0.77	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
24	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.07	1.26 ± 0.85	3.35 ± 0.26	3.25 ± 0.77	2.99 ± 0.54
36	0.61 ± 0.08	0.56 ± 0.00	0.54 ± 0.08	3.36 ± 0.12	3.15 ± 0.19	3.02 ± 0.16
48	0.60 ± 0.13	0.62 ± 0.21	0.64 ± 0.01	3.61 ± 0.21	3.48 ± 0.50	3.69 ± 0.63

^aExt= extracto; Control= (HVM sin fuente de nitrógeno adicional). (Tukey, $p \leq 0.05$).

Tabla 15. Producción de bioetanol y consumo de carbohidratos solubles al utilizar EVMB.

Tiempo (h)	Carbohidratos solubles (g L ⁻¹)			Bioetanol (g L ⁻¹)		
	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a levadura	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a levadura
0	7.11 ± 0.52	7.12 ± 0.45	7.81 ± 0.76	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3	6.00 ± 0.68	6.33 ± 0.17	6.80 ± 0.54	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
6	4.71 ± 1.79	5.90 ± 0.12	6.65 ± 0.66	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
9	4.77 ± 1.05	5.61 ± 0.34	5.61 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
12	3.41 ± 2.78	4.94 ± 0.65	4.59 ± 0.43	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
24	0.41 ± 0.07	0.50 ± 17	0.59 ± 0.04	2.88 ± 0.33	3.30 ± 0.32	3.24 ± 0.33
36	0.38 ± 0.09	0.43 ± 0.07	0.46 ± 0.06	2.62 ± 0.18	2.58 ± 0.32	2.79 ± 0.21
48	0.44 ± 0.07	0.46 ± 0.02	0.43 ± 0.02	2.74 ± 0.22	2.77 ± 0.28	2.81 ± 0.15

^aExt= extracto; Control= (EVMB sin fuente de nitrógeno adicional). (Tukey, $p \leq 0.05$).

En las Tablas 16 y 17 se muestran los valores de rendimiento y productividad del bioetanol generado, utilizando como materias primas la HVM y el EVMB, respectivamente, valores que corresponden a los tiempos de producción de 24, 36 y 48 h. La mayor producción de bioetanol fue a las 24 h en todos los cultivos analizados. Además, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas en los rendimientos de etanol con respecto de sustrato, al adicionar las fuentes de nitrógeno inorgánica u orgánica, cuando se utilizó como fuente de carbono la HVM.

Sin embargo, el rendimiento de etanol fue mayor cuando se utilizó el EVMB como fuente de carbono y la adición de las fuentes de nitrógeno. Fue posible identificar diferencias estadísticamente significativas al comparar los rendimientos de etanol utilizando la HVM contra los rendimientos de etanol utilizando el EVMB, a las 24 h; siendo 1.8 y 1.4 veces más rendimiento al utilizar EVMB con la adición de sulfato de amonio y extracto de levadura, respectivamente. Por lo tanto, este resultado sugiere que la adición de una fuente extra de nitrógeno inorgánico aumenta el rendimiento en el proceso de producción de bioetanol.

Tabla 16. Rendimiento y productividad de bioetanol al utilizar HVM.

Tiempo (h)	Rendimiento (g etOH g azúcar ⁻¹)			Productividad (g etOH L ⁻¹ h ⁻¹)		
	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a Levadura	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a Levadura
24	0.344 ± 0.10	0.273 ± 0.06	0.317 ± 0.02	0.140 ± 0.01	0.135 ± 0.03	0.124 ± 0.02
36	0.431 ± 0.08	0.262 ± 0.02	0.298 ± 0.00	0.093 ± 0.00	0.087 ± 0.01	0.084 ± 0.00
48	0.367 ± 0.10	0.292 ± 0.05	0.367 ± 0.06	0.075 ± 0.00	0.073 ± 0.01	0.077 ± 0.01

^aExt= extracto; Control= (EVMB sin fuente de nitrógeno adicional). (Tukey, $p \leq 0.05$).

Tabla 17. Rendimiento y productividad de bioetanol al utilizar EVMB.

Tiempo (h)	Rendimiento (g etOH g azúcar ⁻¹)			Productividad (g etOH L ⁻¹ h ⁻¹)		
	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a Levadura	Control	(NH ₄) ₂ SO ₄	Ext ^a Levadura
24	0.429 ± 0.03	0.499 ± 0.04	0.449 ± 0.04	0.120 ± 0.01	0.138 ± 0.01	0.135 ± 0.01
36	0.390 ± 0.04	0.386 ± 0.04	0.380 ± 0.02	0.073 ± 0.01	0.072 ± 0.01	0.078 ± 0.01
48	0.410 ± 0.04	0.416 ± 0.01	0.381 ± 0.03	0.057 ± 0.00	0.058 ± 0.01	0.059 ± 0.00

^aExt= extracto; Control= (EVMB sin fuente de nitrógeno adicional). El recuadro en rojo señala los datos en los que se observó diferencia estadísticamente significativa. (Tukey, $p \leq 0.05$).

Se ha demostrado que el agregar una fuente adecuada de nitrógeno, el tiempo de la fermentación se optimiza, aumentando el transporte de azúcares, provocando una tasa acelerada de fermentación (48). Cabe señalar, que el ion amonio ha sido reportado como un estimulador potencial de la producción de etanol mediada por *Saccharomyces cerevisiae* (49), en este trabajo también se sustenta que el sulfato de amonio mejoró los rendimientos de bioetanol. Almeida (50) reporta que la disponibilidad de nitrógeno durante la fermentación ayuda a mantener una alta tasa glicolítica y en consecuencia, la conversión del azúcar en etanol favoreciendo el rendimiento.

7.3. La cepa *S. cerevisiae* BE-256TM, una baja velocidad de agitación y una concentración de 29 g L⁻¹ de fuente de carbono favorecen la producción de bioetanol

Debido a que esta reportado que el tipo de cepa, así como las condiciones de operación son factores que afectan la producción y los rendimientos de etanol, se evaluaron tres diferentes cepas *S. cerevisiae* y se variaron las condiciones de operación como agitación y concentración de azúcares, mediante un diseño experimental Box-Behnken (BB).

La Tabla 18 representa a los coeficientes de regresión para el modelo cuadrático de la producción de bioetanol a las 24 h de fermentación, así como los valores de la prueba de Fisher y de probabilidad. Los resultados del análisis de la falta de ajuste para el modelo matemático indican que el modelo no predice adecuadamente el proceso de producción de bioetanol, además el coeficiente de correlación ajustado fue de 0.63. Guan y Yao (51) sugirieron que R² debería ser al menos 0.80 para el buen ajuste de un modelo.

Se realizó un segundo análisis de varianza para la producción de bioetanol con un tiempo de fermentación de 36 h (Tabla 19). El valor F para este modelo fue 15.79 y al comparar con la F de tablas, sugiere un buen ajuste del modelo con una probabilidad $p < 0.05$ por lo que representa adecuadamente el efecto que tienen las variables sobre la producción de bioetanol.

Para este segundo modelo, el coeficiente de correlación fue de 0.9048, es decir que el 90.48 % de la variación en la producción de etanol es explicada por el polinomio, misma que se atribuye únicamente a los factores independientes.

Tabla 18. Coeficientes de regresión de las variables independientes no codificadas en la producción de bioetanol a las 24 h.

Término	Coef^a	F^b	p^c
a ₀ (X ₀)	-6.53638	3.73	0.080
Lineales			
a ₁ (X ₁)	0.0347689	0.27	0.629
a ₂ (X ₂)	-0.988295	0.11	0.749
a ₃ (X ₃)	0.625765	26.91	0.004
Cuadráticos			
a ₄ (X ₁ ²)	-2.78E-04	2.48	0.176
a ₅ (X ₂ ²)	0.150004	0.28	0.618
a ₆ (X ₃ ²)	-1.40E-02	0.98	0.367
Interacciones			
a ₇ (X ₁ X ₂)	3.46E-03	0.26	0.632
a ₈ (X ₁ X ₃)	1.82E-03	1.47	0.279
a ₉ (X ₂ X ₃)	-0.00407586	0.00	0.949

^aCoef: coeficiente estimado, ^bF: F de la prueba de Fisher, ^cp: valor de la probabilidad. Si $p \leq 0.05$, indica que el término es significativo. El coeficiente de correlación (R^2) fue de 0.8704, R^2 (ajustado) fue de 0.6372 y el error estándar de 0.5423

Esta observación implicó que el modelo resultó adecuado para la representación de la relación real entre los factores seleccionados. Por lo tanto, el modelo cuadrático obtenido en este estudio podría utilizarse en la predicción teórica para la producción de bioetanol.

Tabla 19. Coeficientes de regresión de las variables independientes no codificadas en la producción de bioetanol a las 36 h.

Término	Coef^a	F^b	p^c
a ₀ (X ₀)	5.74039	15.79	0.004
Lineales			
a ₁ (X ₁)	-0.0298789	4.03	0.101
a ₂ (X ₂)	-2.82668	2.15	0.202
a ₃ (X ₃)	0.0785271	126.82	0.000
Cuadráticos			
a ₄ (X ₁ ²)	0.000112323	0.89	0.390
a ₅ (X ₂ ²)	0.16295	0.73	0.432
a ₆ (X ₃ ²)	2.49E-03	0.07	0.805
Interacciones			
a ₇ (X ₁ X ₂)	-5.00E-04	0.01	0.917
a ₈ (X ₁ X ₃)	-4.73E-04	0.22	0.661
a ₉ (X ₂ X ₃)	0.099822	6.04	0.057

^aCoef: coeficiente estimado, ^bF: F de la prueba de Fisher, ^cp: valor de la probabilidad. Si p < 0.05, indica que el término es significativo. El coeficiente de correlación (R²) fue de 0.9660, R² (ajustado) fue de 0.9048 y el error estándar de 0.366805.

La ecuación final en términos de factores no codificados para el modelo cuadrático de superficie de respuesta de Box-Behnken se expresa en la siguiente ecuación:

$$Y(etOH) = 5.7403 - 0.0298X_1 - 2.8266X_2 + 0.0785X_3 + 0.00011X_1^2 + 0.1629X_2^2 + 2.49 \times 10^{-3}X_3^2 - 5.00 \times 10^{-4}X_1X_2 - 4.73 \times 10^{-4}X_1X_3 + 0.0998X_2X_3$$

La anterior ecuación es válida para X₁ en el intervalo de 120-200 rpm, X₂ utilizando solo las cepas *S. cerevisiae* BE-256TM, Safspirit Grain TM y la Wild-type 166, X₃ con rangos de concentración de azúcares iniciales de 20 a 29 g L⁻¹, 20 °C y 36 h de fermentación.

La Tabla 20 desglosa los valores experimentales y predichos para la producción de bioetanol a las 36 h, utilizando el modelo cuadrático anteriormente descrito.

Tabla 20. Producción de bioetanol experimental y predicho utilizando el DOE Box-Behnken. Variables independientes no codificadas: agitación (X_1), tipo de cepa de levadura (X_2), concentración inicial de azúcares (X_3).

Experimento	Variables Independientes			Variable Dependiente		% Error
	X_1 (rpm)	X_2	X_3 (g L ⁻¹)	Producción de Bioetanol (g L ⁻¹) Experimental	Predicho	
1	120	0	20	3.99	4.08	2.03
2	120	2	25	6.14	6.17	0.45
3	120	1	25	5.98	5.65	5.99
4	120	0	29	6.94	7.17	3.17
5	160	3	20	3.73	3.62	2.97
6	160	0	25	5.13	5.29	3.08
7	160	0	25	5.10	5.29	3.55
8	160	1	20	3.92	4.14	5.26
9	160	2	25	5.64	5.29	6.63
10	160	1	29	6.02	6.16	2.41
11	160	3	29	7.70	7.44	3.47
12	200	0	20	3.92	3.72	5.18
13	200	3	25	5.25	5.59	6.06
14	200	1	25	5.17	5.14	0.54
15	200	0	29	6.59	6.47	1.81

Se compararon los valores experimentales y predichos. La desviación relativa del modelo fue inferior al 6.7 % (Tabla 20). De acuerdo con el análisis de varianza (Tabla 19) se observó que la variable con un efecto significativo en la producción de bioetanol es la concentración de azúcares (X_3), y corresponde a un efecto de primer orden, con una $p < 0.05$.

Para observar la interacción y el comportamiento entre las variables se realizaron gráficas de contorno (Figuras 9A, 9B, 9C). Es posible observar con las gráficas, que la producción de bioetanol se favorece al utilizar la cepa 3 que corresponde a *S. cerevisiae* BE-256TM utilizando una concentración de azúcar de 29 g L⁻¹ y una velocidad de agitación de 120 rpm. Por otro lado, la producción de bioetanol disminuye al utilizar niveles de concentración de azúcares menores a los 22 g L⁻¹ independientemente del tipo de cepa y agitación, así como cuando la agitación se incrementa (> 130 rpm) o al cultivar con las cepas Safspirit GrainTM y la Wild-type 166 de *S. cerevisiae*.

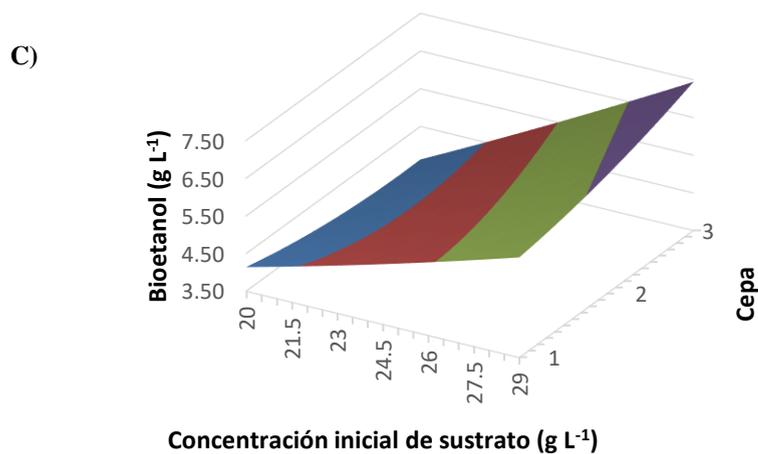
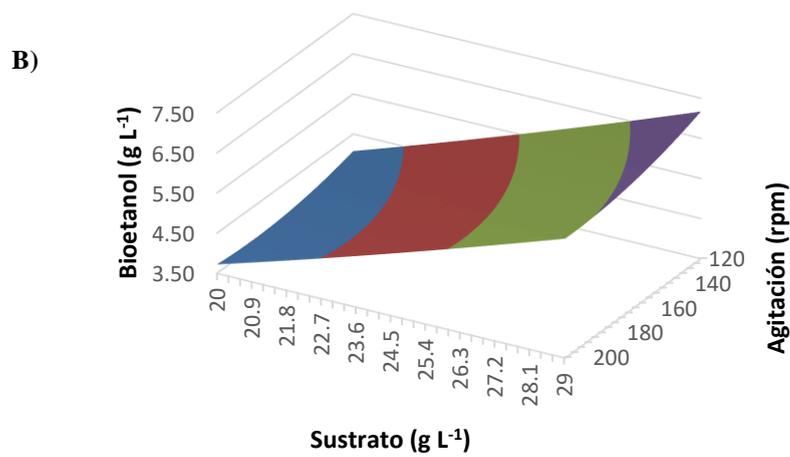
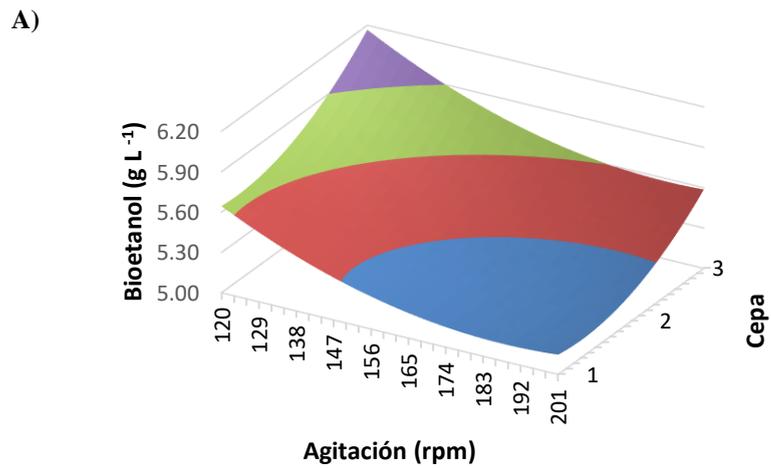


Figura 10. Gráficas de superficie de respuesta que representan el contenido de bioetanol en función de las variables evaluadas mediante el DOE Box-Behnken: A) en función del tipo de cepa y agitación B) en función de concentración de azúcares y agitación, y C) en función de concentración de azúcares y tipo de cepa

7.4. La concentración de bioetanol obtenida es reproducible a nivel biorreactor

El traslado del proceso de fermentación se realizó a nivel biorreactor con base en las condiciones previamente seleccionadas de la metodología de superficie de respuesta que favorecen la producción de bioetanol (concentración de azúcares de 29 g L⁻¹, agitación de 120 rpm y utilizando la cepa *S. cerevisiae* BE-256™). La producción de bioetanol máxima alcanzada fue de 9.96 % v/v es decir 7.86 g L⁻¹, con un rendimiento de 0.27 g g⁻¹ y una productividad de 0.22 g L⁻¹ h⁻¹.

El efecto que tiene el etanol en la célula es una combinación de inhibición del crecimiento celular y una disminución de la viabilidad, por lo que puede actuar como un inhibidor de la fermentación a partir de un 8 % de etanol (20). La producción de etanol suele estar dentro del 10–14 % (v/v) (52).

La levadura utilizada *S. cerevisiae* BE-256™ tiene un rango de tolerancia a etanol de 9 al 11 % (53), la concentración que se obtuvo de 9.96 % se encuentra dentro del rango especificado. La producción de bioetanol reportada al utilizar otras materias primas de acuerdo con la Tabla 3 es superior a la alcanzada en este trabajo debido a que el contenido de azúcares empleados fue 10 veces mayor. Sin embargo, es importante resaltar que la magnitud de etanol producido esta en función de la magnitud de azúcares utilizados, estequiométricamente la relación es: por cada g de glucosa se producen 0.51 g de etanol. De tal forma que entre más azúcares se empleen, la producción de etanol en teoría debe de aumentar, por lo que el dato de producción de etanol no es comparativo si no se emplea la misma cantidad de azúcares.

Uno de los parámetros que nos permite hacer una comparación es el rendimiento sustrato/producto. El rendimiento es la cantidad de producto sintetizado por cantidad de sustrato consumido. Un rendimiento del 0.51 nos indica un aprovechamiento del sustrato del 100 %. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90 % y 95 % del teórico (21).

Otros grupos de trabajo han producido bioetanol utilizando el mismo género *Prosopis* pero diferente especie: *Ceratonia siliqua* (mejor conocido como algarrobo), típica de los países ribereños de la Cuenca mediterránea y América Latina (54), cuyos rendimientos reportados por Roukas (55) y Germec et al. (56) varían entre 40 ± 1.8 % y 48.59 %. El rendimiento que se alcanzó en este trabajo para el último ensayo de fermentación a nivel reactor fue del 52 %. Un rendimiento hasta 23 % mayor al de los grupos de trabajo mencionados anteriormente pero 45 % menor con respecto al rendimiento experimental esperado (90 y 95 %).

7.5. La cerveza artesanal de mezquite posee un porcentaje de alcohol acorde al estilo de cerveza Blonde Ale y califica como excelente con base en el análisis organoléptico

Con el fin de proporcionar valor agregado a la materia prima obtenida de la VM se generó un segundo bioproducto de interés comercial y cuyo proceso es fácil de montar, con base en un proceso artesanal. En este contexto, se generó una cerveza tipo Blonde Ale adicionada con extracto de vaina de mezquite con el fin de proporcionar a esta bebida, el aroma dulce y notas frutales del mezquite.

Para ello, a un cultivo en lote se le agregó EVMA y como control se utilizó la receta original de las cervezas tipo Blonde Ale (Tabla 10). La concentración de alcohol obtenida en la cerveza con EVMA fue de 4 % que fue ligeramente mayor a la cantidad de alcohol presente en la cerveza control (3.6 %), ambos porcentajes de alcohol se encuentran dentro del rango del estilo de cerveza Blonde Ale correspondiente a 3.8-5.5 % (32).

La cerveza Blonde Ale con mezquite y control fueron evaluadas por 5 panelistas externos a nuestra institución y que pertenecen a la empresa de cerveza “La Legendaria” de la ciudad de San Luis Potosí. Los resultados del análisis organoléptico se resumen en la Tabla 21.

En promedio, la cerveza control obtuvo una calificación de 37 puntos que de acuerdo con el formato de evaluación 2012 de BJCP (Anexo 13.1) se posiciona en la categoría de “muy buena” (30-37) concluyendo que se encuentra dentro de los parámetros del estilo Blonde Ale seleccionado, con fallas menores; mientras que la

cerveza con mezquite obtuvo un puntaje de 39.2 puntos, siendo 5.6 % mejor en calificación comparada con la cerveza control. Estos resultados indican que es una cerveza “excelente” (38-44 puntos), y su estilo está acorde al estilo Blonde Ale seleccionado.

Tabla 21. Resultados del análisis organoléptico de acuerdo con el BJCP 2012

Tipo de Cerveza	Blonde Ale Control					Blonde Ale con Mezquite				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Panelista										
Factor*										
Aroma (12)	9	10	9	10	8	7	11	9	9	10
Apariencia (3)	2	3	3	2	2	1	3	3	2	2
Sabor (20)	17	15	10	15	13	15	16	13	16	15
Sensación en la boca (5)	4	4	4	3	3	3.5	4	5	4	4
Impresión General (10)	7	8	6	8	8	6	9	6	8	9
Total (50)	42	40	32	37	34	38	43	36	39	40

* Los números en paréntesis corresponden a los puntos máximos para cada Factor con respecto a la puntuación Total (50).

7.6. El extracto de vaina de mezquite aumenta el contenido polifenólico en la cerveza Blonde Ale

Análisis reportados por Habschied et al. (57) indican que el contenido de polifenoles en cerveza varía ampliamente en rango de 480-855 mg L⁻¹. Esta variación depende de la malta y los lúpulos utilizados, siendo la malta la que aporta mayor cantidad de polifenoles (80 %). Por lo tanto, la relación malta-lúpulo depende en gran medida del tipo de cerveza elaborada. La cantidad de polifenoles totales determinados en la cerveza de mezquite (389.73 mg L⁻¹) se encuentra por debajo del rango mencionado de 480-855 mg L⁻¹, sin embargo, a comparación de la cerveza control (311.73 mg L⁻¹) el contenido fue 20 % mayor.

Estudios recientes correlacionan el consumo de alimentos ricos en polifenoles con la prevención de muchas enfermedades modernas asociadas con el estrés oxidativo (57). Para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre las cervezas generadas se requiere realizar un ensayo con al menos 3 lotes distintos, ya que en este caso solo fue posible analizar un solo lote para cada tipo de cerveza (Blonde Ale y Blonde Ale con EVMA).

VIII.- CONCLUSIONES

La vaina de mezquite es un producto que por su alto contenido de carbohidratos puede aprovecharse en fermentaciones alcohólicas para la obtención de bioetanol y bebidas tradicionales como la cerveza artesanal.

La concentración de carbohidratos alcanzada es de 7 % y 13.44 % para los EVM A y B, respectivamente; con respecto a la HVM sin tamizar la concentración de azúcares es 11.4 % y para la HVM tamizada aumentó 3.4 veces (38.26 %). Debido a las diferencias del contenido de azúcares en la literatura, así como en los reportes de nuestro grupo de trabajo; se sugiere que el contenido de carbohidratos está en función del lugar de recolección.

El contenido de nitrógeno en la HVM de *P. leavigata* es 1.16 veces mayor a lo reportado en otros trabajos y cuando la HVM es sometida a una extracción líquido-sólido mediante tratamiento térmico para la obtención del EVMB, únicamente se solubiliza el 2.18 % del porcentaje total de nitrógeno presente en la HVM.

Con respecto a la producción de bioetanol se presenta una cinética de formación no asociada, al utilizar como fuente de carbono el EVMB de *P. leavigata*. Además, la adición de una fuente extra de nitrógeno inorgánico en el EVMB aumenta el rendimiento de bioetanol.

Es posible representar la producción de bioetanol mediante un modelo de primer orden debido a que el análisis del DOE indica que únicamente la concentración de azúcares tiene un efecto significativo en la producción de etanol, sin embargo de acuerdo con las gráficas de contornos es importante que la velocidad de agitación se mantenga en 120 rpm o a valores inferiores y que se utilice la cepa *S. cerevisiae* BE-256™.

La cerveza con extracto de vaina de mezquite es una propuesta innovadora que está acorde con el estilo Blonde Ale, y que además posee polifenoles que se relacionan con la prevención de muchas enfermedades modernas asociadas con el estrés oxidativo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Gallegos JA, Rocha NE, Gonzalez RF, García MA. Efecto del procesamiento térmico sobre la capacidad antioxidante de pinole. *CyTA Journal of Food*. 2013; 11(2): p. 162-170.
2. Torres L, Vaca M, Carpinteyro-Urban S. Use of *Prosopis leavigata* seed gum and *Opuntia ficus-indica* mucilage for the treatment of municipal wastewaters by coagulation-flocculation. *Natural Resources*. 2012; 3: p. 35-41.
3. Hernández JA, Valenzuela LM, Flores A, Ríos JC. Análisis dimensional para determinar volumen y peso de madera de mezquite (*Prosopis L.*). *Madera y Bosques*. 2014; 20(3): p. 155-161.
4. Rodríguez EN, Rojo GE, Ramírez B, Martínez R, Cong MdIC, Medina SM, et al. Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Wild.) en México. *Ra Ximhai*. 2014; 10(3): p. 173-193.
5. López M. Tesis. Mezquite (*Prosopis laevigata*) como alternativa para la recuperación de suelos contaminados por cobre. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2017.
6. Instituto Nacional de Investigaciones forestales ayp. Campo Potosino. [Online].; 2019 [cited 2019 junio 3. Available from: <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php?id=24>.
7. García-López JC, Durán-García HM, de-Nova JA, Álvarez-Fuentes G, Pinos-Rodríguez JM, Lee-Ranged H, et al. Producción y contenido nutrimental de vainas de tres variantes de mezquite (*Prosopis laevigata*) en el Altiplano Potosino, México. *Agrociencia*. 2019;(53): p. 821-831.
8. Pérez GS. Acciones y compromisos para el desarrollo sustentable. [Online].; 2010. Available from: http://ford.ciesas.edu.mx/2do_encuentro.htm.
9. Ruiz TDR. Tesis: Uso potencial de la vaina de mezquite para la alimentación de animales domésticos del altiplano potosino. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina; 2011.
- 10 Meraz S, Orozco J, Lechuga Á, Cruz F, Vernon J. El mezquite, árbol de gran utilidad. *Revista Ciencias* 51. 1998 julio-septiembre: p. 20-21.

- 11 Díaz L, Hernández JP, Guitérrez R, Téllez A, Castro J, Pérez R, et al. Nutritional . Characterization of *Prosopis laevigata* Legume Tree (Mesquite) Seed Flour and the Effect of Extrusion Cooking on its Bioactive Components. *Foods*. 2018; 7(124): p. 1-9.
- 12 Cerón AN, Vidal AY, Ángeles MA. Impacto del estado de madurez de la vaina . de mezquite (*Prosopis leavigata*) en su composición fisicoquímica posterior a su transformación en polvo. *Revista Congreso Nacional de Ingeniería y Tecnologías para el Desarrollo Sustentable*. 2015; 1: p. 1-7.
- 13 Soto X, Fernández K, Ruiz M. Aprovechamiento del fruto del mezquite (*Prosopis glandulosa y prosopis spp*) en la zona de San Luis Rio Colorado, Sonora, para la elaboración y comercialización de harina de alto valor nutricional. In Ramos M, Aguilera V, editors. *Ciencias Agropecuarias*. Guanajuato: ECORFAN; 2014.
- 14 Senatore A, Dalena F, Sola A, Marino A, Valletta V, Basile A. First-generation . feedstock for bioenergy production. In Basile A, Dalena F. *Second and Third Generation of Feedstocks.*; 2019: p. 35-57.
- 15 Zamora F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In Moreno MV, Polo MC, . editors. *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York, NY: Springer; 2009: p. 1-20.
- 16 Puerta QGI. Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. . Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. 2010: p. 1-12.
- 17 Ocón ME. Tesis Doctoral. Divesidad de levaduras no-*Saccharomyces* en . diferentes ecosistemas vitivinícolas. Logroño: Universidad de la Rioja; 2014.
- 18 Mohammad J. T, Keikhosro K. Chapter 12. Fermentation Inhibitors in Ethanol . Processes and Different Strategies to Reduce Their Effects. In Larroche C, Pandey A, Gnansounou E, Kumar S, Claude-Gilles D, Ricke S. *Biomass, Biofuels, Biochemical*. Amsterdam: Academic Press; 2011: p. 287-311.
- 19 Villadsen J, Nielsen J, Lidén G. *Bioreaction Engineering Principles* New York: . Plenum Publisher; 2003.
- 20 Suárez C, Garrido NA, Guevara C. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la . producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*. 2016; 50(1): p. 20-28.

- 21 Vázquez HJ, Dacosta O. Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *INGENIERÍA Investigación y Tecnología V.* 2007; VIII(4): p. 249-259.
- 22 Zabed H, Faruq G, Sahu JN. Bioethanol production from fermentable sugar juice. *The Scientific World Journal.* 2014: p. 1-11.
- 23 Liu R, Shen F. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC1308). *Bioresource Technology.* 2008; 99(4): p. 847-854.
- 24 Maiorella B, Blanch H, Wilke C. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *S. cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering.* 1983; 25: p. 103-121.
- 25 Mohd Azhar H, Abdulla R, Azmah Jambo S, Marbawi H, Azlan Gansau J, Mohd Faik AA, et al. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2017 Julio; 10: p. 52-61.
- 26 CropEnergies A. *cropenergies.* [Online].; 2017 [cited 2019 marzo 1. Available from: <http://www.cropenergies.com/Pdf/en/Bioethanol.pdf>.
- 27 Cadena Agroindustrial. Etanol Nicaragua: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura; 2004.
- 28 Seale and Associates. *Bebidas alcohólicas en México.* México; 2018.
- 29 Ferreira IMPLVO. Beer Carbohydrates. In Preedy VR. *Beer in Health and Disease Prevention.* Porto; 2009: p. 291-298.
- 30 Rajendram R, Preedy VR. 41- Ethanol in Beer: Production, Absorption and Metabolism. In Preedy VR. *Beer in Health and Disease Prevention.* London: Academic Press; 2009: p. 431-440.
- 31 Wunderlich S, Back W. Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. In *Beer in Health and Disease Prevention.*: Elsevier; 2009. p. 1-15.
- 32 Brewers Association. 2019 Beer Style Guidelines. [Online].; 2019 [cited 2020 abril 10. Available from: <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style->

guidelines/?fbclid=IwAR0n1gIVznPkjwlxwNMv0JFEhJL4DFFswVPoE2diwqMSifwgfNHkGiVTzaA.

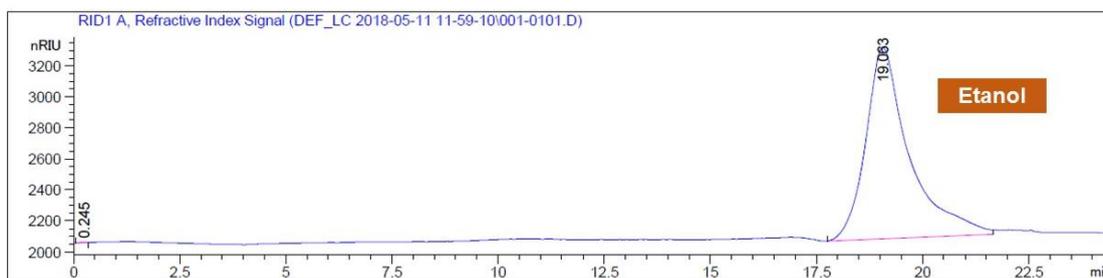
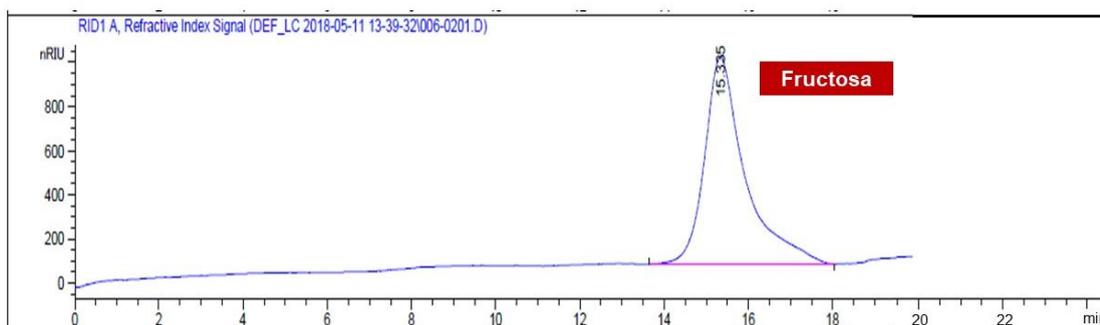
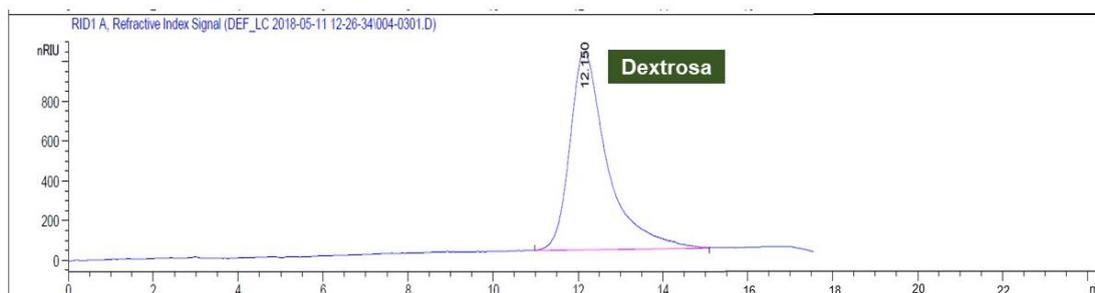
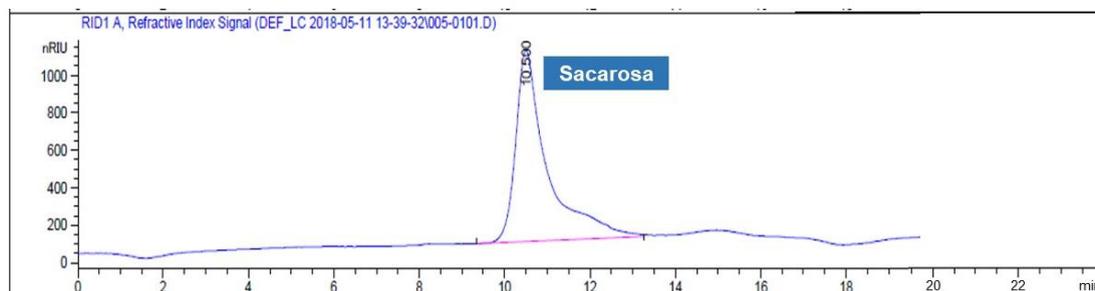
- 33 Lee S, Speight G, Loyalka K. Handbook of Alternative Fuel technologies Florida: . CRC Press Taylor & Francis Group; 2007.
- 34 Camps MM, Marcos MF. Los Biocombustibles. 2nd ed. Madrid: Mundi-Prensa; . 2008.
- 35 Nicolas R. car-engineer. [Online].; 2014 [cited 2020 Noviembre 23. Available . from: <https://www.car-engineer.com/adapting-an-engine-to-ethanol-fuel-flex-fuel/>.
- 36 Dávila PA, Ortiz I. Simulación del Proceso de Producción del Éter Etil Tert- . Butílico (ETBE). Influencia de la Relación Etanol/Isobuteno. Revista Información Tecnológica. 2004; 15(2): p. 3-6.
- 37 García C. Bioetanol. In Biocombustibles ¿energía o alimento?; 2014: p. 77. .
- 38 Chen L, Gao K, Zhang C, Lang W. Chapter 2- Alternative fuels for IC engines . and jet engines and comparison of their gaseous and particulate matter emissions. In Advanced Biofuels: Woodhead Publishing; 2019: p. 17-64.
- 39 Hernández D. Tesis: Producción de bioetanol a partir de vainas de mezquite. . San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2019.
- 40 López RAdC. Tesis: Desarrollo de una metodología de análisis por HPLC para . evaluar parámetros de calidad en la cerveza artesanal. San Luis Potosí: Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2017.
- 41 Doran PM. Chapter 4 - Material Balances. In Doran PM. Bioprocess Engineering . Principles. Second ed.: Academic Press; 2013: p. 87-137.
- 42 Blake D, Feltus A, Fitzpatrick T, Linsner M, Zainasheff , Beechum D, et al. Guía . de Estilos de Cerveza England K, editor.: Beer Judge Certification Program; 2015.
- 43 haztucheve.com. Haz tu cheve.com. [Online].; 2010 [cited 2020 Abril 17. . Available from: <http://www.haztucheve.com/>.

- 44 Moreno-Indias I. Beneficios de los polifenoles contenidos en la cerveza sobre la microbiota intestinal. *Nutr. Hosp.* 2012; 34(4): p. 41-44.
- 45 Peña LY, Yáñez L, Rodríguez J, Juárez B. Chemical composition and in vitro degradation of red and white mesquite (*Prosopis laevigata*) pods. *South African Journal of Animal Science.* 2014; 44(3): p. 299-206.
- 46 Felker P, Takeoka G, Dao L. Pod Mesocarp Flour of North and South American Species of Leguminous Tree *Prosopis* (Mesquite); Composition and Food Applications. *Food REviews Internation.* 2013; 29(1): p. 46-66.
- 47 Ingledew WM. Very High gravity (VHG) and associated new technologys for fuel alcohol production. Duluth, USA: Ethanol Technology Institute; 2017 c.
- 48 Arrizon J, Gschaedler A. Effects of the addition of different nitrogen sources in the tequila fermentation process at high sugar concentration. *Journal of Applied Microbiology.* 2007; 102: p. 1123-1131.
- 49 Inei G, Velasco HA, Gutiérrez GF, Hernández H. Statistical approach to optimization of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of Valfor 100 Zeolite NAA. *Revista Mexicana de Ingeniería Química.* 2009; 8(3): p. 256-270.
- 50 Almeida EL, Moreira e Silva G, Vassalli IdA, Silva M, Santana WC, da Silva P, et al. Effects of nitrogen supplementation on *Saccharomyces cerevisiae* JP14 fermentation for mead production. *Journal Food Sci. Technol.* 2020 Junio; 40(1): p. 336-343.
- 51 Guan X, Yao H. Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chem.* 2008; 51: p. 345.
- 52 Darvishi F, Abolhasan N. Optimization of an Industrial Medium form Molasses for Bioethanol Production Using the Taguchi Statistical Experimental-Design Method. *Fermentation.* 2019; 5(14
- 53 Fermentis bL. fermentis.com. [Online].; 2019 [cited 2020 Noviembre 22]. Available from: <https://fermentis.com/en/fermentation-solutions/you-create-beer/safale-be-256/>.

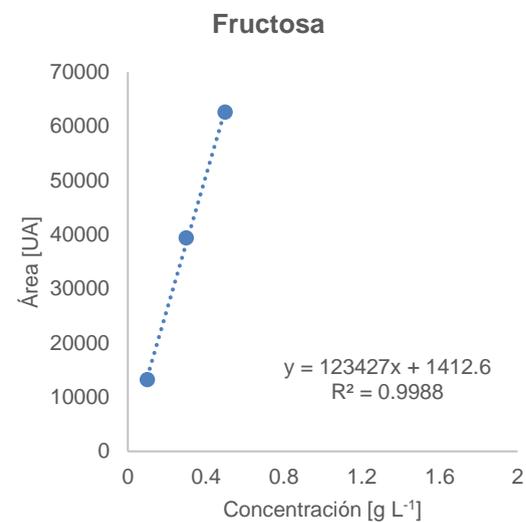
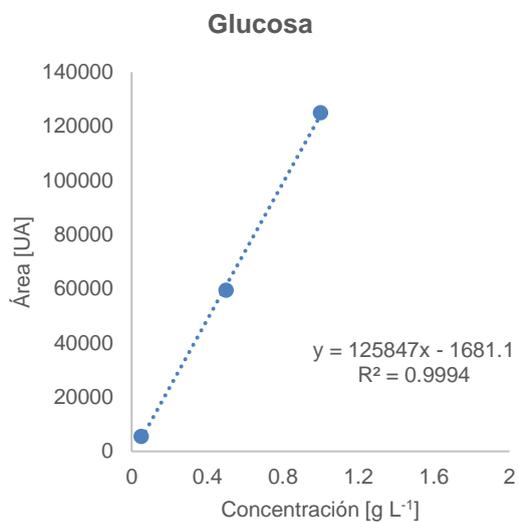
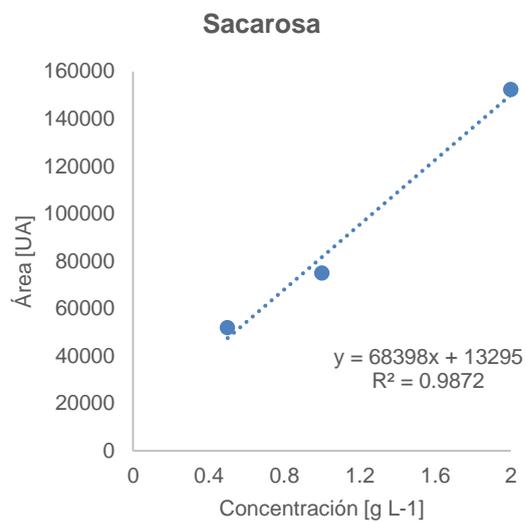
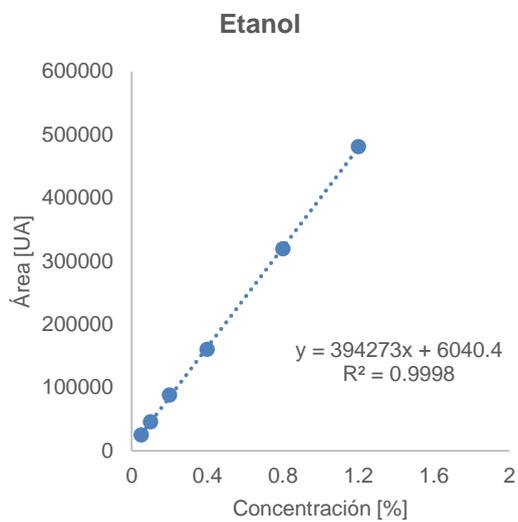
- 54 Guillén A, Ferrer-Gallego PP, Serena V, Peris JB. El Algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.), importancia paisajística, económica y perspectivas de futuro. *Chronica nature*. 2018; 7: p. 45-54.
- 55 Roukas T. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1994 Abril; 59(4).
- 56 Germec M, Karhan M, Turhan I, Demirci A. Ethanol production via repeated-batch fermentation from carob pod extract by using *Saccharomyces cerevisiae* in biofilm reactor. *Journal Fuel*. 2015; 161: p. 304-311.
- 57 Habschied K, Loncaric A, Mastanjevic K. Screening of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers. *Foods*. 2020; 9(2): p. 238.

X.- ANEXOS

10.1 Cromatogramas y tiempos de retención para sacarosa, dextrosa, fructosa y etanol por HPLC



10.2. Líneas Patrón de etanol, sacarosa, dextrosa y fructosa



10.3 Hojas de evaluación para análisis organoléptico



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
Use Regular BJCP Scoresheet for Full Evaluation and Feedback



<http://www.bjcp.org>

Copyright © 2012 — BJCP, Inc.

<http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) _____ Style/Category _____ Entry # _____
 Judge BJCP ID/Rank _____ Special Ingredients: _____
 Judge Email _____ Other Notes: _____

INSTRUCTIONS: '■' or '☑' boxes for attributes you perceive. Circle any boxes where style expectations were not met.

AROMA				Malt	Hops	Esters	Other	12	
# Aspect	☑	L	M	H	<input type="checkbox"/> Grainy	<input type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> 'Fruity'	<input type="checkbox"/> Brett	☐ Flawed
Malt	<input type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit					
Hops	<input type="checkbox"/> Bready	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic					
Esters	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke					
Phenols	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input type="checkbox"/> Herbal	<input type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice					
Alcohol	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous					
Sweetness	<input type="checkbox"/> Roasty	<input type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood					
Acidity	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> _____					
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments >				

APPEARANCE				Color Specifiers							3		
# Aspect	☑	L	M	H	Beer	<input type="checkbox"/> Straw	<input type="checkbox"/> Yellow	<input type="checkbox"/> Gold	<input type="checkbox"/> Amber	<input type="checkbox"/> Copper	<input type="checkbox"/> Brown	<input type="checkbox"/> Black	☐ Flawed
Clarity	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Head	<input type="checkbox"/> White	<input type="checkbox"/> Ivory	<input type="checkbox"/> Cream	<input type="checkbox"/> Beige	<input type="checkbox"/> Tan	<input type="checkbox"/> Brown		
Head Size	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Other	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Lace	<input type="checkbox"/> Legs	<input type="checkbox"/> Opaque				
Head Retention	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments >								
Head Texture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>									

FLAVOR				Malt	Hops	Esters	Other	Balance	20	
# Aspect	☑	L	M	H	<input type="checkbox"/> Grainy	<input type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> 'Fruity'	<input type="checkbox"/> Brett	<input type="checkbox"/> Malty	☐ Flawed
Malt	<input type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	<input type="checkbox"/> Hoppy					
Hops	<input type="checkbox"/> Bready	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic	<input type="checkbox"/> Even					
Esters	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke						
Phenols	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input type="checkbox"/> Herbal	<input type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice						
Sweetness	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous						
Bitterness	<input type="checkbox"/> Roasty	<input type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood						
Alcohol	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> _____						
Acidity	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments >					
Harshness	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						

MOUTHFEEL				Flaws	Finish	Comments	5
# Aspect	☑	L	M	H	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Cloying	☐ Flawed
Body	<input type="checkbox"/> Gushed	<input type="checkbox"/> Sweet					
Carbonation	<input type="checkbox"/> Hot	<input type="checkbox"/> Medium					
Warmth	<input type="checkbox"/> Harsh	<input type="checkbox"/> Dry					
Creaminess	<input type="checkbox"/> Slick	<input type="checkbox"/> Biting					
Astringency	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments >		

OVERALL IMPRESSION			Drinkability	Comments	10
Assessment	L	M	H	<input type="checkbox"/> I would finish this sample	☐ Flawed
Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> I would drink a pint of this beer	
Technical Merit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> I would pay money for this beer	
Intangibles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Please send me the recipe!!!	

TOTAL		Use back of sheet for additional comments		50
Scoring Guide	Outstanding (45-50): World-class example of style	Good (21-29): Misses the mark on style and/or minor flaws	☐ Flawed	
	Excellent (38-44): Exemplifies style well, requires minor tuning	Fair (14-20): Off flavors, aromas or major style deficiencies		
	Very Good (30-37): Generally within style parameters, minor flaws	Problem (0-13): Major off flavors and aromas dominate		

FLAWS (check where perceived or by indicating L, M or H intensity) See http://www.bjcp.org/faults.php for suggested fixes.											
Fault	Aroma	Flavor	Mouth	Fault	Aroma	Flavor	Mouth	Fault	Aroma	Flavor	Mouth
Acetaldehyde				Light-struck				Sour/Acidic			
Alcoholic/Hot				Medicinal				Smoky			
Astringent				Metallic				Spicy			
Diacetyl				Musty				Sulfur			
DMS				Oxidized				Vegetal			
Estery				Plastic				Vinegary			
Grassy				Solvent/Fusel				Yeasty			



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
Use Regular BJCP Scoresheet for Full Evaluation and Feedback



http://www.bjcp.org

Copyright © 2012 — BJCP, Inc.

http://www.homebrewersassociation.org

Judge Name (print) JUDY COOPER Bernabeu Serrano Style/Category Blonde Ale Entry #

Judge BJCP ID/Rank Special Ingredients: Mezquite

Judge Email cooper0347@hotmail.com Other Notes:

INSTRUCTIONS: or boxes for attributes you perceive. Circle any boxes where style expectations were not met.

AROMA				Malt	Hops	Esters	Other	12	
#	Aspect	<input checked="" type="checkbox"/> L	<input type="checkbox"/> M	<input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> Grainy	<input checked="" type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> 'Fruity'	<input type="checkbox"/> Brett.	9
	Malt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	
	Hops	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Bready	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic	
	Esters	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke	
	Phenols	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input type="checkbox"/> Herbal	<input checked="" type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice	
	Alcohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous	
	Sweetness	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Roasty	<input type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood	
	Acidity	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/>	
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments > <u>AROMA MUY AGRADABLE, SE PERCIBEN UNOS MUELTOS HOP BITTS</u>				

APPEARANCE				Color Specifiers								3	
#	Aspect	<input checked="" type="checkbox"/> L	<input type="checkbox"/> M	<input type="checkbox"/> H	Beer	<input type="checkbox"/> Straw	<input type="checkbox"/> Yellow	<input checked="" type="checkbox"/> Gold	<input type="checkbox"/> Amber	<input type="checkbox"/> Copper	<input type="checkbox"/> Brown	<input type="checkbox"/> Black	2
	Clarity	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Head	<input checked="" type="checkbox"/> White	<input type="checkbox"/> Ivory	<input type="checkbox"/> Cream	<input type="checkbox"/> Beige	<input type="checkbox"/> Tan	<input type="checkbox"/> Brown		
	Head Size	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Other	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Lace	<input type="checkbox"/> Legs	<input type="checkbox"/> Opaque				
	Head Retention	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments > <u>LOW TOW AMARILLO DEBIDO TRANSLUCENTE UN POCO MAS DEBE SER UN POCO MAS OPAQUE</u>								
	Head Texture	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>									

FLAVOR				Malt	Hops	Esters	Other	Balance	20	
#	Aspect	<input checked="" type="checkbox"/> L	<input type="checkbox"/> M	<input type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> Grainy	<input checked="" type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> 'Fruity'	<input type="checkbox"/> Brett.	<input type="checkbox"/> Malty	17.
	Malt	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	<input checked="" type="checkbox"/> Hoppy	
	Hops	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Bready	<input checked="" type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic	<input type="checkbox"/> Even	
	Esters	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke		
	Phenols	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input checked="" type="checkbox"/> Herbal	<input checked="" type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice		
	Sweetness	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous		
	Bitterness	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Roasty	<input type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood		
	Alcohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Burnt	<input checked="" type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/>		
	Acidity	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments > <u>LOS GUSTOS (READER DE UNO MAS O UNO) MUY AGRADABLE</u>					
	Harshness	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						
		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>						

MOUTHFEEL				Flaws	Finish	Comments	5
#	Aspect	<input checked="" type="checkbox"/> L	<input type="checkbox"/> M	<input type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Cloying	4
	Body	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Gushed	<input type="checkbox"/> Sweet	
	Carbonation	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Hot	<input type="checkbox"/> Medium	
	Warmth	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Harsh	<input type="checkbox"/> Dry	
	Creaminess	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Slick	<input type="checkbox"/> Riling	
	Astringency	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Comments > <u>MUCHO TAN SORDO MUY UN POCO DE GAS EN BOCA UN POCO AGUADO Y POCO DE BUENA MANERA.</u>		

OVERALL IMPRESSION				Drinkability	Comments	10
#	Assessment	L	M	H	<input type="checkbox"/> I would finish this sample	7.
	Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> I would drink a pint of this beer	
	Technical Merit	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> I would pay money for this beer	
	Intangibles	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Please send me the recipe!!	

TOTAL				Use back of sheet for additional comments		50
Score	Outstanding (45-50):	World-class example of style		Good (21-29):	Misses the mark on style and/or minor flaws	
Guide	Excellent (38-44):	Emphasifies style well, requires minor tuning		Fair (14-20):	Off flavors, aromas or major style deficiencies	
Score	Very Good (30-37):	Generally within style parameters, minor flaws		Problem (0-13):	Major off flavors and aromas dominate	

Mouth 7.

1

3.5

6

3

Monencia Mezquite.

Muy utilizada, no es un árbol muy pesado de bajar, carece de transparencia de blanco de

General, los sabores de la res son una mezcla, esta nota amaderada, un toque muy agradable,
el carácter ligero o poco perceptible, esta combinación de una textura y sabor no
sea muy agradable.



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
Use Regular BJCP Scoresheet for Full Evaluation and Feedback



<http://www.bjcp.org>

Copyright © 2012 — BJCP, Inc.

<http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) WALTERA ROSARIO MARTINEZ Style/Category BLONDE ALE Entry #

Judge BJCP ID/Rank Special Ingredients: MEZQUITE

Judge Email maximof98@hotmail.com Other Notes:

INSTRUCTIONS: ■ or ☑ boxes for attributes you perceive. Circle any boxes where style expectations were not met.

AROMA		Malt	Hops	Esters	Other	12
# Aspect	☑ L M H	<input type="checkbox"/> Grainy	<input checked="" type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> Fruity	<input type="checkbox"/> Brett.	10 11
Malt	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input checked="" type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	
Hops	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Bready	<input type="checkbox"/> Floral	<input checked="" type="checkbox"/> Banana	<input checked="" type="checkbox"/> Lactic	
Esters	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke	
Phenols	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input checked="" type="checkbox"/> Herbal	<input type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice	
Alcohol	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous	
Sweetness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Roasty	<input checked="" type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood	
Acidity	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> _____	
Comments > <u>HAKE UN PERO MASO FINO</u>						

APPEARANCE		Beer	Head	Other	Color Specifiers	3
Aspect	☑ L M H	<input checked="" type="checkbox"/> Straw	<input type="checkbox"/> White	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Yellow	3 3
Clarity	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Gushed	<input type="checkbox"/> Hot	<input type="checkbox"/> Harsh	<input type="checkbox"/> Gold	
Head Size	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Slick	<input type="checkbox"/> Dry	<input type="checkbox"/> Biting	<input type="checkbox"/> Amber	
Head Retention	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments > <u>APARECER UNO</u>				
Head Texture	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>					

FLAVOR		Malt	Hops	Esters	Other	Balance	20	
# Aspect	☑ L M H	<input checked="" type="checkbox"/> Grainy	<input type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> Fruity	<input type="checkbox"/> Brett.	<input type="checkbox"/> Malty	15 16	
Malt	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input checked="" type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	<input type="checkbox"/> Hoppy		
Hops	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Bready	<input checked="" type="checkbox"/> Floral	<input checked="" type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic	<input type="checkbox"/> Even		
Esters	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke			
Phenols	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input checked="" type="checkbox"/> Herbal	<input checked="" type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice			
Sweetness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous			
Bitterness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Roasty	<input checked="" type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood			
Alcohol	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> _____			
Acidity	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments > <u>ESTRATEGIA A ESPICER JANGO NOTA A MADERA AMARRADA</u>						
Harshness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Se sente maso amaro y alcoholico						
Flaws								
Finish								
Comments								

MOUTHFEEL		Flaws	Finish	Comments	5
Aspect	☑ L M H	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Cloying	4 4	
Body	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Gushed	<input type="checkbox"/> Sweet		
Carbonation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Hot	<input checked="" type="checkbox"/> Medium		
Warmth	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Harsh	<input type="checkbox"/> Dry		
Creaminess	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Slick	<input type="checkbox"/> Biting		
Astringency	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments > <u>FINO MASO LARGO Y MUY ASTRINGENTE, AUNQUE DEN UN SABOR MAS MANCOSO A ESPICER.</u>			

OVERALL IMPRESSION		Drinkability	Comments	10
Assessment	L M H	<input type="checkbox"/> I would finish this sample	8 9	
Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> I would drink a pint of this beer		
Technical Merit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> I would pay money for this beer		
Inangibles	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Please send me the recipe!!!		

TOTAL		Use back of sheet for additional comments		50
Scoring	Outstanding (45-50): World-class example of style	Good (21-29): Misses the mark on style and/or minor flaws	40 43	
Guides	Excellent (38-44): Exemplifies style well, requires minor tuning	Fair (14-20): Off flavors, aromas or major style deficiencies		
	Very Good (30-37): Generally within style parameters, minor flaws	Problem (0-13): Major off flavors and aromas dominate		

FLAWS (check where perceived or by indicating L, M or H intensity) See <http://www.bjcp.org/faults.php> for suggested fixes.



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
Use Regular BJCP Scoresheet for Full Evaluation and Feedback



<http://www.bjcp.org>

Copyright © 2012 — BJCP, Inc.

<http://www.homebrewersassociation.org>

Judge Name (print) Luis Rogelio Aranda Style/Category 18A Entry #

Judge BJCP ID/Rank Special Ingredients: ~~Wheat~~ (Blond Ale)

Judge Email caracab@fakelander.com Other Notes:

INSTRUCTIONS: or boxes for attributes you perceive. Circle any boxes where style expectations were not met.

AROMA		Malt	Hops	Esters	Other	12
# Aspect	L M H	<input checked="" type="checkbox"/> Grainy	<input checked="" type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> Fruity	<input type="checkbox"/> Brett.	9
Malt	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input checked="" type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	
Hops	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Bready	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic	
Esters	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke	
Phenols	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input type="checkbox"/> Herbal	<input type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice	
Alcohol	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous	
Sweetness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Roasty	<input type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood	
Acidity	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments >				

APPEARANCE		Beer	Color Specifiers	3
Aspect	L M H	<input type="checkbox"/> Straw	<input type="checkbox"/> Yellow <input checked="" type="checkbox"/> Gold	3
Clarity	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> White	<input type="checkbox"/> Cream	
Head Size	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Legs	
Head Retention	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lace	<input type="checkbox"/> Opaque	
Head Texture	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments >		

FLAVOR		Malt	Hops	Esters	Other	Balance	20
# Aspect	L M H	<input checked="" type="checkbox"/> Grainy	<input type="checkbox"/> Citrusy	<input type="checkbox"/> 'Fruity'	<input type="checkbox"/> Brett.	<input type="checkbox"/> Malty	10
Malt	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Caramel	<input type="checkbox"/> Earthy	<input type="checkbox"/> Apple/Pear	<input type="checkbox"/> Fruit	<input type="checkbox"/> Hoppy	
Hops	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Bready	<input type="checkbox"/> Floral	<input type="checkbox"/> Banana	<input type="checkbox"/> Lactic	<input type="checkbox"/> Even	
Esters	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Rich	<input type="checkbox"/> Grassy	<input type="checkbox"/> Berry	<input type="checkbox"/> Smoke	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Phenols	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Dark Fruit	<input checked="" type="checkbox"/> Herbal	<input type="checkbox"/> Citrus	<input type="checkbox"/> Spice	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Sweetness	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Toasty	<input type="checkbox"/> Piney	<input type="checkbox"/> Dried Fruit	<input type="checkbox"/> Vinous	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Bitterness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Roasty	<input type="checkbox"/> Spicy	<input type="checkbox"/> Grape	<input type="checkbox"/> Wood	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Alcohol	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Acidity	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments >					
Harshness	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>						
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>						

MOUTHFEEL		Flaws	Finish	Comments	5
Aspect	L M H	<input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Cloying	4	
Body	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Gushed	<input type="checkbox"/> Sweet		
Carbonation	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Hot	<input type="checkbox"/> Medium		
Warmth	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Harsh	<input checked="" type="checkbox"/> Dry		
Creaminess	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Slick	<input type="checkbox"/> Biting		
Astringency	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Comments >			

OVERALL IMPRESSION		Drinkability	Comments	10
Assessment	L M H	<input checked="" type="checkbox"/> I would finish this sample	6	
Stylistic Accuracy	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> I would drink a pint of this beer		
Technical Merit	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> I would pay money for this beer		
Intangibles	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Please send me the recipe!!!		

TOTAL		Use back of sheet for additional comments		50
Score	Outstanding (45-50): World-class example of style	Good	(21-29): Misses the mark on style and/or minor flaws	32
Guide	Excellent (38-44): Exemplifies style well, requires minor tuning	Fair	(14-20): Off flavors, aromas or major style deficiencies	
	Very Good (30-37): Generally within style parameters, minor flaws	Problem	(0-13): Major off flavors and aromas dominate	

FLAWS (check where perceived or by indicating L, M or H intensity) See <http://www.bjcp.org/fauls.php> for suggested fixes.



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
Use Regular BJCP Scoresheet for Full Evaluation and Feedback



http://www.bjcp.org

Copyright © 2012 — BJCP, Inc.

http://www.homebrewersassociation.org

Judge Name (print) Ana Luisa Jones Ochoa Style/Category Blonde-Ale Entry #

Judge BJCP ID/Rank Special Ingredients: Mezquite

Judge Email anacochoa07@gmail.com Other Notes:

INSTRUCTIONS: or boxes for attributes you perceive. Circle any boxes where style expectations were not met.

AROMA		Malt	Hops	Esters	Other	12	
#	Aspect	L M H	<input type="checkbox"/> Grainy <input checked="" type="checkbox"/> Caramelk <input checked="" type="checkbox"/> Bready x <input type="checkbox"/> Rich <input type="checkbox"/> Dark Fruit <input type="checkbox"/> Toasty <input type="checkbox"/> Roasty <input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Citrusy x <input type="checkbox"/> Earthy x <input type="checkbox"/> Floral <input type="checkbox"/> Grassy <input checked="" type="checkbox"/> Herbal <input type="checkbox"/> Piney <input type="checkbox"/> Spicy <input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Fruity <input type="checkbox"/> Apple/Pear <input type="checkbox"/> Banana <input type="checkbox"/> Berry <input type="checkbox"/> Citrus <input type="checkbox"/> Dried Fruit <input type="checkbox"/> Grape <input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> Brett. <input checked="" type="checkbox"/> Fruit <input type="checkbox"/> Lactic <input type="checkbox"/> Smoke <input type="checkbox"/> Spice <input type="checkbox"/> Vinous <input type="checkbox"/> Wood	10 <input type="checkbox"/> Flawed

APPEARANCE		Beer	Head	Other	Color Specifiers	3
#	Aspect	L M H	<input type="checkbox"/> Straw <input checked="" type="checkbox"/> White <input type="checkbox"/> Flat	<input type="checkbox"/> Ivory <input type="checkbox"/> Lace	<input checked="" type="checkbox"/> Gold x <input type="checkbox"/> Cream <input type="checkbox"/> Legs <input type="checkbox"/> Amber <input type="checkbox"/> Copper <input type="checkbox"/> Tan <input type="checkbox"/> Opaque	2 <input type="checkbox"/> Flawed

FLAVOR		Malt	Hops	Esters	Other	Balance	20
#	Aspect	L M H	<input type="checkbox"/> Grainy x <input checked="" type="checkbox"/> Caramel <input checked="" type="checkbox"/> Bready x <input type="checkbox"/> Rich <input type="checkbox"/> Dark Fruit <input checked="" type="checkbox"/> Toasty x <input type="checkbox"/> Roasty <input type="checkbox"/> Burnt	<input type="checkbox"/> Citrusy <input checked="" type="checkbox"/> Earthy x <input type="checkbox"/> Floral <input type="checkbox"/> Grassy x <input checked="" type="checkbox"/> Herbal x <input type="checkbox"/> Piney <input type="checkbox"/> Spicy <input type="checkbox"/> Woody	<input type="checkbox"/> Fruity <input type="checkbox"/> Apple/Pear <input type="checkbox"/> Banana <input type="checkbox"/> Berry <input type="checkbox"/> Citrus <input type="checkbox"/> Dried Fruit <input type="checkbox"/> Grape <input type="checkbox"/> Stone Fruit	<input type="checkbox"/> Brett. <input type="checkbox"/> Fruit <input type="checkbox"/> Lactic <input type="checkbox"/> Smoke <input type="checkbox"/> Spice <input type="checkbox"/> Vinous <input type="checkbox"/> Wood	15 <input type="checkbox"/> Flawed

MOUTHFEEL		Flaws	Finish	Comments	5
#	Aspect	L M H	<input type="checkbox"/> Flat <input type="checkbox"/> Gushed <input type="checkbox"/> Hot <input type="checkbox"/> Harsh <input type="checkbox"/> Slick	<input type="checkbox"/> Cloying <input type="checkbox"/> Sweet <input type="checkbox"/> Medium <input type="checkbox"/> Dry <input type="checkbox"/> Biting	3 <input type="checkbox"/> Flawed

OVERALL IMPRESSION		Drinkability	Comments	10
#	Assessment	L M H	<input type="checkbox"/> I would finish this sample <input checked="" type="checkbox"/> I would drink a pint of this beer <input checked="" type="checkbox"/> I would pay money for this beer <input type="checkbox"/> Please send me the recipe!!!	7 <input type="checkbox"/> Flawed

TOTAL		Use back of sheet for additional comments		50
Score	Outstanding (45-50): World-class example of style	Good (21-29): Misses the mark on style and/or minor flaws		37 <input type="checkbox"/> Flawed
Guide	Excellent (38-44): Exemplifies style well, requires minor tuning	Fair (14-20): Off flavors, aromas or major style deficiencies		39
	Very Good (30-37): Generally within style parameters, minor flaws	Problem (0-13): Major off flavors and aromas dominate		

