



EVALUACIÓN DE LÍNEAS EXPERIMENTALES DE TRITICALE PARA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL

**Trabajo final de graduación presentado para obtener el título de
Ingeniera Agrónoma.**

Autora:

ALARCÓN HERRERA, Leandra

Directora:

Dra. Ing. Agr. PICCA, Aurora

Cátedra: Genética y Mejoramiento Genético de Plantas y Animales - FA-UNLPam

Codirectora:

Mg. Ing. Agr. QUIRIBAN, Adriana

Cátedra: Química Biológica - FA-UNLPam

Evaluadores:

Mg. Ing. Agr. FERRARI, Enzo

FA-UNLPam

Mg. Ing. Agr. PEREYRA CARDOZO, María C.

FA-UNLPam

**FACULTAD DE AGRONOMÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA
Santa Rosa, La Pampa - Argentina, 2023**

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
MATERIAL VEGETAL.....	16
DETERMINACIONES	17
<i>Contenido de proteína</i>	17
<i>Contenido de almidón</i>	18
<i>Determinación de Falling Number o número de caída (s)</i>	18
<i>Producción de bioetanol</i>	18
<i>Protocolo de germinación:</i>	19
<i>Digestión enzimática:</i>	21
<i>Fermentación:</i>	21
<i>Rendimiento:</i>	21
<i>Destilación:</i>	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Humedad	23
Cenizas.....	23
Proteína	24
Almidón	25
<i>Falling Number</i>	26
Bioetanol	27
Coeficiente autoamilolítico (AAQ)	32
Grados Brix	33
CONCLUSIONES	35
AGRADECIMIENTOS	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Progresión mundial de la producción de triticale en los últimos años.....	7
Figura 2: Proyección de la evolución mundial del mercado de bioetanol.....	9
Figura 3: Esquema de los tratamientos realizados en este trabajo para la obtención de bioetanol.....	19
Figura 4: Registro fotográfico de los pasos realizados en la obtención de bioetanol..	20
Figura 5: Producción de bioetanol (ml ETO.kg ⁻¹ MS) de los seis genotipos analizados bajo los cuatro tratamientos realizados	30
Figura 6: Producción de bioetanol (ml ETHO.kg ⁻¹ MS) para los tratamientos germinados y sin germinar en función del agregado de enzimas	31
Figura 7: Producción de bioetanol diario (ml día ⁻¹) para los cuatro tratamientos	32

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Tabla 1: Ranking mundial de los países de mayor producción de triticale.....	7
Tabla 2: Nombre y procedencia de los materiales utilizados.....	16
Tabla 3: Datos obtenidos en el análisis proximal realizado a las líneas experimentales de triticale.....	24
Tabla 4: Valores medios de caracteres asociados a la producción de bioetanol en triticales evaluados en la temporada 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina.	27
Tabla 5: Análisis de la varianza de caracteres asociados a la producción de bioetanol en triticales evaluados en la temporada 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina.. .	27
Tabla 6: Rendimiento de bioetanol, grados brix y coeficiente autoamilolítico (AAQ) de las líneas experimentales de triticale analizadas en granos germinados y sin germinar, con y sin el agregado de enzima alfa amilasa.....	28
Tabla 7: Cuadrados medios de la producción de bioetanol (ETOH) y grado brix en genotipos probados durante 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina..	29
Tabla 8: Cuadrados medios del Coeficiente autoamilolítico (AAQ) en genotipos probados durante 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina.	33
Tabla 9: Comparación de medias entre los distintos genotipos de triticale probados durante el año 2021 para la producción de bioetanol y grados brix.....	34

RESUMEN

El bioetanol es el biocombustible que más se produce a nivel mundial. El principal efecto beneficioso del bioetanol como fuente de combustibles es que se puede producir a partir de material vegetal renovable. Las materias primas para la producción de bioetanol deben ser sostenibles y no deben amenazar la biodiversidad o la seguridad alimentaria. Existen avanzados estudios en la utilización de triticale, como materia prima en la producción de bioetanol. El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades químicas del grano de triticale de seis genotipos; analizar y comparar la producción de bioetanol con y sin el agregado de alfa - amilasa exógena, y analizar a la par el efecto de la germinación en la producción de bioetanol. La producción de bioetanol presentó diferencias significativas entre genotipos y con el agregado de enzimas, pero no presentó diferencias asociadas a la germinación. Los genotipos de mayor producción de bioetanol fueron CIM 820, con una media de 484.3 ml kg⁻¹MS, CIM 830 (469.85 ml kg⁻¹ MS) y CIM 826 (458.7 ml kg⁻¹ MS). Los genotipos con menor producción fueron Espiga cuadrada (418.2 ml kg⁻¹ MS) y CIM3/75 (418.5 ml kg⁻¹ MS). Las diferencias observadas entre los genotipos no pudieron asociarse con las propiedades químicas analizadas.

Palabras clave: Triticosecale, biocombustibles, fermentación alcohólica, germinación, alfa amilasas

ABSTRACT

Bioethanol is the most widely produced biofuel worldwide. The main beneficial effect of bioethanol as a fuel source is that it can be produced from renewable plant material. The raw materials for bioethanol production must be sustainable and must not threaten biodiversity or food security. There are advanced studies on the use of triticale as a raw material in bioethanol production. The objective of this work was to evaluate the chemical properties of triticale grain of six genotypes; to analyze and compare bioethanol production with and without the addition of exogenous alpha-amylase, and to analyze the effect of germination on bioethanol production. Bioethanol production showed significant differences between genotypes and with the addition of enzymes, but there were no differences associated with germination. The genotypes with the highest bioethanol production were CIM 820, with an average of 484.3 ml kg⁻¹ DM, CIM 830 (469.85 ml kg⁻¹ DM) and CIM 826 (458.7 ml kg⁻¹ DM). The genotypes with the lowest production were Espiga cuadrada (418.2 ml kg⁻¹ DM) and CIM3/75 (418.5 ml kg⁻¹ DM). The differences observed between genotypes could not be associated with the chemical properties analyzed.

Key words: Triticosecale, biofuels, alcoholic fermentation, germination, alpha amylases

INTRODUCCIÓN

El triticale (\times *Triticosecale* sp. Wittmack) fue el primer cereal híbrido obtenido por el hombre, proveniente de la cruce entre trigo (*Triticum* sp Linnaeus) como progenitor femenino y centeno (*Secale cereale* sp Linaeus) como progenitor masculino. Se desarrolló para conjugar los atributos positivos de ambos progenitores en una sola planta, como la utilidad del trigo en productos alimenticios y la tolerancia del centeno al crecimiento en ambientes no óptimos (McGoverin et al., 2011).

Los triticales graníferos actuales tienen, comparándolos con el trigo, buen potencial de rendimiento en ambientes sujetos a déficit hídricos y/o nutricionales y bajo estrés inducido por patógenos (Lonbani & Arzani, 2011), en otras palabras, el triticale es apto para ambientes con bajos costos de producción (Ramacciotti et al., 2010).

La producción mundial de triticale aumentó considerablemente en las últimas décadas, en la actualidad se cultiva en más de 30 países en todo el mundo. Según datos informados por FAOSTAT (2023) la producción en el año 2000 fue de 2.5 millones de toneladas llegando a 15.5 millones en el año 2020 con un pico histórico de 17 millones en el año 2014 (Figura 1). La última información publicada corresponde al año 2021 en el que la producción mundial de triticale fue de 14,846,162.66 toneladas, obtenidas en una superficie cosechada de 4,025,148 hectáreas, lo que representa un rendimiento promedio de 3.7 toneladas por hectárea. Los productores principales son Polonia, Alemania, Bielorusia y Francia, y representan el 70.73 % de la producción mundial (Tabla 1).



Figura 1: Progresión mundial de la producción de triticale en los últimos años. (Elaboración propia con datos de FAOSTAT 2023: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>)

Tabla 1: Ranking mundial de los países de mayor producción de triticale. Modificado de <https://www.tridge.com/es/intelligences/triticale/production>

Posición	País	País	Capacidad de producción
		2020	2020
1	Polonia	39.58%	6.08M
2	Alemania	13.26%	2.04M
3	Bielorrusia	10.05%	1.54M
4	Francia	7.84%	1.20M
5	España	5.12%	786.97K
6	Lituania	2.85%	437.26K
7	China	2.65%	406.39K
8	Austria	2.14%	328.27K
9	Rusia	2.02%	310.46K
10	Hungría	1.98%	304.60K

En nuestro país, el triticale se ha difundido para pastoreo directo, heno o como grano forrajero. La Encuesta Nacional Agropecuaria no lo contempla como cultivo pero existen indicadores de su adopción. La producción de semilla fiscalizada, tomada como indicador de su adopción, pasó de 196 tn en 2002/03 a 504 tn en 2007/08 y 1.040 tn en 2010. Para el año 2018 se informaron 1520 tn que cayeron a 1100 para el año 2021 (INASE, 2003,

2008, 2010, 2011, 2018, 2021). Si a esto se le agrega la semilla identificada, la comercializada ilegalmente y la destinada a uso propio, se estima que la producción de semilla podría ser bastante superior a las mil cien toneladas mencionadas en el informe. Aunque el triticale es tradicionalmente usado para alimentación animal, en años recientes, ha habido un incremento en el interés por su utilización en productos de alimentación humana. Se han desarrollado varios productos alimenticios y bebidas, incluyendo pan, galletitas, pasta, malta, bebidas alcohólicas, yogur e incluso films biodegradables (Zhu et al., 2018).

Los usos actuales del triticale están ampliamente determinados por su composición química, que es más similar a la del trigo que a la del centeno. Esto es reflejo de sus proporciones genómicas, ya que dos de sus genomas provienen del trigo (A y B) y uno proviene del centeno (R) (Varughese et al., 1996). Existe una amplia variación en la composición química del triticale, lo que sugiere su potencial como cereal alternativo para varios usos alimenticios, producción de bebidas y biocombustibles (McGoverin et al., 2011; Zhu et al., 2018). Los parámetros óptimos de grano para la producción de etanol, difieren de aquellos requeridos para panadería o grano alimenticio (McGoverin et al., 2011).

El bioetanol es el biocombustible que más se produce a nivel mundial, representa actualmente más del 80% de la producción de biocombustibles, seguido por el biodiesel. En lo que a producción de etanol se refiere EEUU es seguido por América Latina, Asia y Europa. A comienzos del siglo XXI, su producción se encontraba focalizada en Brasil (Finola y Torres et al., 2022). Se proyecta que para el 2030 el mercado de bioetanol mundial llegue a 124.5 mil millones de dólares (Figura 2). (Precedence Research, 2022)

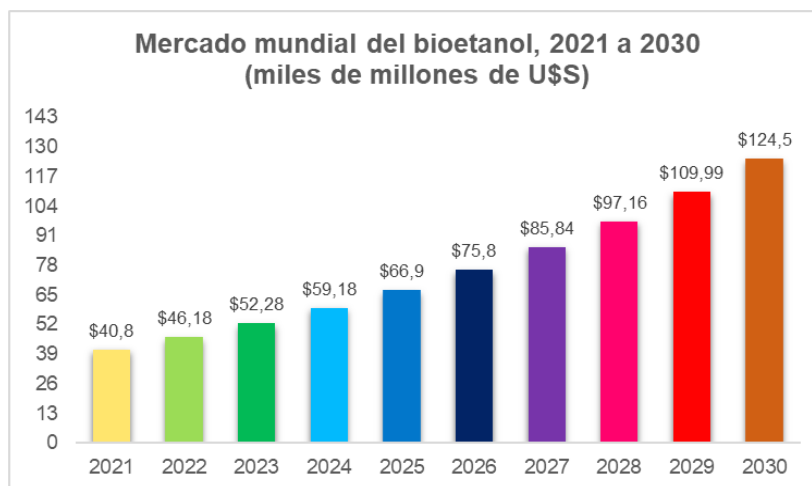


Figura 2: Proyección de la evolución mundial del mercado de bioetanol. Modificado de www.precedenceresearch.com

El principal efecto beneficioso del bioetanol como fuente de combustibles con respecto a los combustibles fósiles, es que se puede producir a partir de material vegetal renovable. La producción de bioetanol ha aumentado notablemente porque muchos países buscan reducir las importaciones de petróleo, impulsar las economías rurales y mejorar la calidad del aire. La desventaja más obvia es que su producción puede competir por el uso de recursos alimenticios. Por esta razón una de las líneas de investigación más relevantes se encuentra en la búsqueda y modificación de materias primas, para interferir lo menos posible en la producción de alimentos y utilizar de forma más eficiente la energía del proceso (Chuck-Hernández et al., 2011; Peijin et al., 2015).

A nivel mundial, Estados Unidos y Europa utilizan principalmente almidón proveniente de maíz y de trigo y cebada, respectivamente, para la producción de bioetanol mientras que Brasil, mayor productor latinoamericano, utiliza caña de azúcar (Balat et al., 2010; Goldemberg et al., 2014). En la Argentina, Córdoba y Tucumán dominan la producción de este biocombustible. Salta y Jujuy son provincias que han sumado su parte en el esquema nacional pero su participación es menor (Finola y Torres et al., 2022). Hasta el año 2012, el bioetanol provenía exclusivamente de la caña de azúcar (Alegre et al., 2012).

En la actualidad existen varias plantas de producción de bioetanol en base a granos de maíz, como Bio4, ubicada en Río Cuarto, Córdoba, que tiene una producción de 50 millones de litros anuales con una capacidad instalada de 82 millones de litros por año (<http://www.bio4.com.ar>). Con ellos se pretende cubrir la demanda interna del mercado de etanol que en estos momentos no alcanza para garantizar el corte del 5% en las naftas. La elaboración de bioetanol en 2022 mostró un crecimiento del 14,6%, mientras que las ventas internas se incrementaron en 11,6%, impulsadas por el segmento de bioetanol a base de maíz, cuya producción creció 30,9% (Trade News, 2023). Las cinco plantas industriales que hacen etanol a base de maíz para ser mezclado con nafta se localizan en zonas alejadas del puerto. Estas son: Diaser en la provincia de San Luis; Bio4, ProMaíz y ACABio en la provincia de Córdoba y Vicentín en la provincia de Santa Fe (Finola y Torres et al., 2022).

La biomasa que puede ser utilizada para la obtención de etanol es aquella que contiene azúcares simples o polisacáridos, y básicamente se puede clasificar en tres tipos principales: a) fuentes con alto contenido de azúcares (caña de azúcar, frutas, melazas, remolacha azucarera); b) fuentes con alto contenido de almidón (cereales como maíz, trigo, sorgo y cebada y también tubérculos como yuca y papa) y c) fuentes con alto contenido de celulosa (residuos de podas, madera, papel, etc.) (Alegre & Copia et al., 2010).

En orden de alcanzar el objetivo de crecimiento en la producción de biocombustibles durante las próximas décadas, es esencial extender las fuentes de materia prima a cultivos de producción más económica. Las materias primas para la producción de bioetanol deben ser sostenibles y no deben amenazar la biodiversidad o la seguridad alimentaria. Por tal motivo es crítica la incorporación de nuevos cultivos de alta productividad y de buena adaptación a condiciones climáticas y edáficas. Al respecto, existen avanzados

estudios en la utilización de triticale, como materia prima en la producción de bioetanol (Pejin et al., 2009; García-Aparicio et al., 2011; Badiali & Maic et al., 2013; McKenzie et al., 2014; Pejin et al., 2015; Kossatz et al., 2017).

Se ha descubierto que las variedades modernas de triticale son muy competitivas como materia prima para la producción de bioetanol. Los cultivos de triticale tienen un alto potencial de rendimiento, así como un alto contenido de almidón, junto con un bajo contenido de polisacáridos solubles y proteínas, por lo que se considera ideal para la producción de bioetanol. Existe una alta actividad de las enzimas amilolíticas propias del triticale, principalmente de alfa-amilasa, y esto es crucial en la sacarificación del almidón (Pejin et al., 2009; Pejin et al., 2015).

Además, el triticale permite la producción de etanol de segunda generación a partir de la utilización del salvado o afrecho (García-Aparicio et al., 2011; Kossatz et al., 2017).

El almidón es el mayor polisacárido de reserva dentro de las células vegetales, dispuesto en forma de gránulos de diferentes tamaños y formas, y puede contener impurezas de algunas mezclas de lípidos, proteínas y otros carbohidratos (Tester et al., 2004). Químicamente, está formado por el entrecruzamiento de biopolímeros de amilosa y amilopectina, unidos por múltiples monómeros de glucosa mediante enlaces glucosídicos α -D-(1 \rightarrow 4 y 1 \rightarrow 6). La amilosa es un polisacárido lineal debido a los enlaces glucopiranosil α -D-(1 \rightarrow 4), mientras que la amilopectina tiene la única diferencia de presentar mayor cantidad de enlaces α -D-(1 \rightarrow 6), pero en su composición prevalecen uniones α -D-(1 \rightarrow 4) (Tester et al., 2004; Mojovic et al., 2009).

La hidrólisis del almidón puede considerarse un paso clave en el procesamiento de las materias primas a base de este polisacárido, para la producción de bioetanol (Mojovic et al., 2009). La función principal de este paso es proporcionar de manera efectiva la

conversión de amilosa y amilopectina a azúcares fermentables que posteriormente podrían convertirse en etanol por levaduras o bacterias.

El almidón se puede transformar en glucosa vía hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática; la primera es un proceso más antiguo que actualmente se ha abandonado y reemplazado principalmente por el proceso enzimático, que es más eficiente (Mojovic et al., 2009). La principal ventaja de la hidrólisis enzimática, comparado con la hidrólisis química, radica en la no formación de subproductos y la reducción en la demanda energética del proceso ya que no requiere el uso de grandes presiones ni elevadas temperaturas. El proceso enzimático consta de dos etapas consecutivas, denominadas licuefacción y sacarificación, en donde intervienen las enzimas amilasas y glucoamilasas, respectivamente (Castaño y Mejia et al., 2008).

Las amilasas son una clase de hidrolasas ampliamente distribuidas en microbios, plantas y animales; cataliza específicamente la hidrólisis del enlace interno α -D-1-4 glucosídico del almidón (Muralikrishna & Nirmala et al., 2005). Estas enzimas son las más estudiadas e importantes en el campo biotecnológico e industrial y son imprescindibles en la elaboración de productos alimenticios, combustibles y medicamentos (Bedón Gomez et al., 2013); también juegan un papel importante tanto en el desarrollo como en la germinación de semillas (Muralikrishna & Nirmala et al., 2005) ya que cuando se inicia este proceso; el almidón comienza a degradarse por acción de estas enzimas con la finalidad de proporcionar moléculas de glucosa que serán oxidadas para producir la energía necesaria para el desarrollo del embrión.

Las alfa amilasas están presentes en pequeñas cantidades en el grano sin germinar pero su concentración aumenta rápidamente con la germinación (Macri et al., 1986b). La actividad de amilasas es menor en el endosperma libre de salvado que en el grano entero;

dicha actividad se ve influenciada por los niveles de nitrógeno y los estadios de madurez del grano (Singh et al., 1978).

La cantidad de enzimas endógenas para la hidrólisis del almidón y los parámetros de hidrólisis como el pH, la temperatura, la concentración del sustrato y el tiempo del proceso dependen del tipo de materia prima, de su composición química y del potencial autoamilolítico nativo, entre otros factores (Mojovic et al., 2009). Se ha demostrado, tiempo atrás, que granos de cereales como trigo y centeno manifiestan actividad autoamilolítica. Estas actividades enzimáticas se usaban a menudo en el proceso tradicional sin presión llamado proceso de maceración en frío. El coeficiente autoamilolítico se define como la relación entre el rendimiento de etanol sin el agregado de enzimas técnicas y el rendimiento de bioetanol con la combinación óptima de enzimas técnicas (Senn & Pieper et al., 2001; Pejin et al., 2009).

En la producción de bioetanol, el criterio principal es un alto contenido de almidón ya que se requiere al menos un 60%, además de otros factores importantes como la actividad amilolítica, (alfa-amilasa), el índice de viscosidad (FN) y el grado de gelificación del almidón entre otros (Kucerova et al., 2007).

En este sentido, Kádár et al., (2011), y Thomsen et al., (2007), realizaron estudios en los que evaluaron el efecto de la activación de enzimas endógenas de granos de cereales con el fin de utilizarlas para la hidrólisis del almidón. Es decir, se germinaron los granos utilizando métodos tradicionales aplicados en el malteado para la producción de cerveza, para que se activen las enzimas amilasas presentes en el grano. Este proceso, desarrolla enzimas que se requieren para hidrolizar el almidón complejo en el grano en simples azúcares fermentables. La germinación permite el desarrollo del embrión, y se sintetizan, activan y movilizan las enzimas hidrolíticas (proteasas y amilasas) que solubilizan las reservas del grano. Si bien en el comienzo de la germinación con altas temperaturas se

alcanza una alta producción inicial de enzimas, el desarrollo de las mismas puede depender de las condiciones de crecimiento (Kádár et al., 2011; Yan et al., 2010) trabajando con sorgo brotado encontraron que la germinación no solo mejoraba la performance de la fermentación sino que activaba enzimas intrínsecas y acortaba el tiempo de fermentación.

Uno de los criterios de aplicabilidad del triticale para estos fines productivos, es la elevada actividad alfa-amilasa endógena (Muñoz-Insa et al., 2016; Peña et al., 2004; Mojovic et al., 2009; Pejin et al., 2009, Pejin et al., 2015) condición propicia para la producción de bioetanol, porque acelera la etapa de hidrólisis del almidón, por lo que el proceso de fermentación transcurre en un tiempo relativamente corto (Kucerova et al., 2007) y; además permitiría disminuir o independizarse del agregado exógeno de enzimas amilolíticas (Picca et al., 2021).

Según Mellado et al., (2008) el triticale tiene tendencia a la germinación de precosecha y a producir elevados niveles de actividad de la enzima alfa amilasa. La facilidad con la que el triticale produce altos niveles de α -amilasa y alta actividad proteolítica, en combinación con las bajas temperaturas de gelatinización (59-65 °C), tiene su lado positivo: permite que el triticale funcione bien en malteado y elaboración de cerveza (Mergoum & Macpherson et al., 2004), siendo esta condición también propicia para la producción de etanol.

El análisis del *Falling Number* (FN) o tiempo de caída o índice de caída (Hagberg et al., 1960) mide el daño del almidón en los granos por acción de la enzima alfa amilasa en una germinación temprana. Durante el método se produce la gelatinización rápida de una suspensión de harina o cereal molido en un baño de agua mantenido a 100 °C. La acción de la alfa amilasa sobre el almidón de la muestra produce la licuefacción del gel, midiéndose el tiempo (en segundos) de caída del émbolo agitador. Desde el punto de vista

de la calidad panadera, 250 segundos es un valor óptimo para las harinas de trigo, por debajo de 200, comienzan a surgir problemas de calidad por exceso de alfa amilasa que se traducen en miga pegajosa, tendencia al aplanamiento y corteza oscura. Por el contrario, si la actividad de alfa amilasas es baja, el pan tiene un pobre desarrollo y presenta una corteza pálida (Stefan et al., 2015). Una alta actividad de las alfa amilasas, si bien no es una condición propicia para la calidad panadera, es muy favorable para la producción de bioetanol, porque permitiría independizarse del agregado exógeno de enzimas amilolíticas (Picca et al, 2021). Según Pol-Szyszko & Podsiadło et al., (2021), la actividad alfa-amilasa y el índice de caída son parámetros suficientes para realizar una evaluación rápida y fácil de la utilidad del cultivo para la producción de bioetanol.

HIPÓTESIS

La amplia variación de la composición química del triticale permite su análisis como cereal alternativo para ser utilizado en producción de bioetanol.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar la producción de bioetanol en base a diferencias en las propiedades químicas del grano de triticale y del contenido de amilasas, modificado por el agregado exógeno o por la germinación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las propiedades químicas de líneas experimentales de triticale utilizadas en la producción de bioetanol, por medio de un análisis proximal.
- Comparar la producción de bioetanol de seis líneas experimentales con y sin el agregado de alfa-amilasa en forma exógena a fin de evaluar la capacidad autoamilolítica del material en estudio.

- Analizar el efecto del uso de granos germinados en la producción de bioetanol en triticale.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

El estudio se realizó durante el año 2021, en el Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de La Pampa, ubicado en la ruta 35, km 334, Santa Rosa, La Pampa (Argentina), a 36° 46' de latitud sur y 64° 17' longitud oeste y a 210 msnm (metros sobre el nivel del mar). Los genotipos de triticale utilizados fueron seis líneas experimentales de triticale granífero, provenientes del programa de Mejora de Germoplasma de Triticáceas que se lleva adelante en la Facultad de Agronomía de la UNLPam (Tabla 2). El suelo se clasificó como Paleustol petrocálcico (Soil Survey Staff, 2014) con escasa pendiente superficial y un manto de tosca en el subsuelo, a una profundidad que varió entre 1.0 y 1.5 m; y proporciones de 10% de arcilla, 25% de limo y 65% de arena, que clasificaron al suelo como de textura franco arenoso. El suelo se caracterizó por presentar, a los 25 cm de profundidad, valores promedio de pH = 6.1, nitratos = 16.4 mg kg⁻¹, fósforo = 10.8 mg kg⁻¹ y 1.5% de materia orgánica.

Tabla 2: Nombre y procedencia de los materiales utilizados

Nombre del genotipo	Procedencia
ESPIGA CUADRADA	UNLPam
CIM 3/75	CIMMYT
CIM 820	CIMMYT
CIM 826	CIMMYT
CIM 829	CIMMYT
CIM 830	CIMMYT

UNLPam: Universidad Nacional de La Pampa; CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.

Las líneas se sembraron bajo un diseño en bloques completos al azar con tres repeticiones, la parcela constó de siete surcos de cinco metros de largo y separados a 20 cm, la siembra se realizó el 6 de julio de 2021, con una densidad de 250 semillas m⁻². No se aplicaron fertilizantes, el lote provenía de rastrojo de alfalfa. El manejo agronómico antes y durante el ciclo fue similar al adoptado por los productores regionales. En madurez fisiológica se cosechó cada unidad experimental. Los granos se acondicionaron de forma manual, se eliminó la suciedad y el material inerte.

DETERMINACIONES

Las determinaciones químicas y la producción de bioetanol se realizaron en el Laboratorio de Química de la Facultad de Agronomía de la UNLPam.

Primeramente se realizó un análisis proximal, para predecir el perfil productivo de etanol de las líneas evaluadas.

Contenido de humedad (%) (IRAM 15850)

El contenido de humedad se determinó, en harina y en grano, por método gravimétrico en estufa a 130°C durante 60 minutos. Se pesaron 5 g de grano y 2 g de harina, esta última se obtuvo por molienda de los granos en un molino Delver modelo MPD 1011A.

Contenido de ceniza (% sobre materia seca) AACC Método 08-12 1995

El contenido de cenizas se determinó en grano y harina de triticale. Se pesaron 2 grs de muestra, se llevó a mufla a 550°C hasta peso constante, aproximadamente 3 horas.

Contenido de proteína (Método de Kjeldhal).

Se utilizó el Micro Método de Kjeldhal modificado para ácido bórico (Método 46-12, AACC, 2000). Los valores de proteína se calcularon como N x 5.7 y ajustados a 14 % de humedad. Se pesó 0.1 g de la muestra, se agregó la mezcla catalítica y 3 ml de ácido

sulfúrico y se llevó a digerir. Posteriormente, se agregaron 20 ml de agua destilada y perlita de vidrio. Una vez fría la solución, se colocaron 20 ml de NaOH 10 N y se llevó a destilar. El destilado se recibió en una solución de Ác Bórico al 2% con indicador. Finalmente, se tituló con una solución de Ácido Sulfúrico 0.01 N (previamente valorada con un patrón primario).

Contenido de almidón

La extracción y cuantificación del contenido de almidón se realizó según el método descrito por de Souza et al., (2016) con modificaciones. Se realizó una extracción alcalina donde 50 g de harina de triticale se suspendieron en 750 ml de NaOH al 0.18%; esta mezcla se incubó 30 minutos a 40°C en baño térmico con agitación. La suspensión se centrifugó a 3.380 xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y la capa de almidón subyacente, se volvió a suspender en 125 ml del solvente, se centrifugó y se eliminó nuevamente el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces más sobre el residuo de almidón utilizando agua destilada. Luego se llevó a estufa a 30°C durante 36 h. El almidón seco se almacenó en un frasco plástico hasta su posterior análisis.

Determinación de Falling Number o número de caída (s). (Método 56-81 B; AACC, 2000)

Se produce la gelatinización rápida de una suspensión de harina o cereal molido en un baño de agua mantenido a 100°C. La acción de la alfa – amilasa sobre el almidón de la muestra produce la licuefacción del gel. Se mide el tiempo total en segundos, requeridos para agitar y permitir que el émbolo agitador recorra una distancia determinada a través de dicha suspensión, contenida en el tubo viscométrico.

Producción de bioetanol

Para esta determinación se utilizó la metodología descrita por Pejin et al., (2009) con modificaciones. Se trabajó con granos germinados y sin germinar. Los tratamientos con

y sin agregado de enzimas técnicas hacen referencia exclusivamente a la enzima α amilasa. Por el contrario, la enzima β -glucosidasa fue agregada en todos los tratamientos. Las determinación con y sin enzima alfa amilasa, se realizó con el fin de evaluar la capacidad autoamilolítica del material en estudio (Figura 3)

Protocolo de germinación:

Se remojaron 100 g de granos en 300 ml de agua a temperatura ambiente durante 16 horas (Figura 4.1).

Los granos húmedos se extendieron sobre bandejas cubiertas con papel de filtro y se saturaron con agua. Las bandejas se sellaron con envoltura de plástico y se colocaron a 20°C durante un día para la germinación. Los granos germinados (Figura 4.2) se secaron a 50°C durante 3 horas, se molieron y se usaron como sustrato para la fermentación de etanol.

Los granos de triticale se molieron en un Molino Butt hasta un tamaño de partícula menor a 1 mm de diámetro (Figura 4.3). El material molido se sometió a una reacción de digestión enzimática y fermentación con las enzimas α -amilasa proveniente de una cepa de *Bacillus licheniformis* y B-glucosidasa proveniente de una cepa de *Aspergillus niger* con el agregado de levadura Ethanol Red.

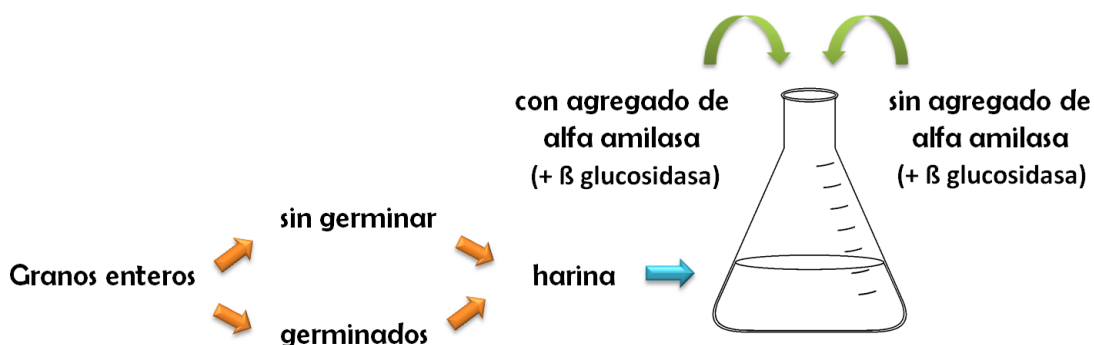


Figura 3: Esquema de los tratamientos realizados en este trabajo para la obtención de bioetanol



Figura 4: Registro fotográfico de los pasos realizados en la obtención de bioetanol

- 1 Semillas en remojo para germinar
- 2 Semillas germinadas
- 3 Proceso de molienda de semillas
- 4 Preparación de muestras previamente pesadas
- 5 Muestras en baño térmico
- 6 Muestras después del proceso fermentativo
- 7 Muestras preparadas para llevar a centrifugar
- 8 Ultracentrífuga HITACHI Himac CR 22G.
- 9 Muestras listas para destilar
- 10 Proceso de destilación del bioetanol

Digestión enzimática:

30 gramos de muestra fueron colocados en erlenmeyers de 250 ml (Figura 4.4), a los que se le agregó 100 ml de medio de fermentación (extracto de levadura, 0.3%; peptona de carne, 0.35%; KH_2PO_4 , 0.2%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1%; pH 5.5) previamente calentado a 60°C y 400 uL de enzima α -amilasa (Spyzeme R RSL). Los frascos se mantuvieron en un baño térmico Vicking, Modelo Dubnoff con agitación orbital a 125 rpm, a 60°C por 30 minutos en una primera etapa y 80°C por 60 minutos en una segunda etapa. Posteriormente fueron enfriados hasta 53-55°C y el pH ajustado a 4 - 4.5 con HCl 1N. En estas condiciones fueron agregados 100 uL de enzima glucoamilasa (Distillase R SSF). Los frascos fueron llevados nuevamente al baño térmico a 53 - 55°C durante 30 minutos en agitación.

Fermentación:

Se enfriaron los frascos a temperatura ambiente (20-25°C) y se les agregó 3 ml de *Saccharomyces cerevisiae* (1.2 g/100 ml). Los frascos fueron cerrados con tapas de fermentación (válvulas Air Lock CO_2) y se mantuvieron en baño térmico a 30°C, con agitación, durante 96 horas aproximadamente (Figura 4.5).

Rendimiento:

La determinación del rendimiento de bioetanol se realizó por gravimetría. Para esto se pesaron los frascos antes y después del proceso fermentativo (Figura 4.6).

Destilación:

Luego de la fermentación, se centrifugaron 250 ml de la muestra fermentada durante 15 minutos a 10000 rpm y 4°C en una ultracentrifugadora HITACHI Himac CR 22G.

Se realizó una destilación fraccionada para separar el etanol de la mezcla de líquidos. Se calentó el sobrenadante de la centrifugación en un balón de 1000 ml con perlititas de vidrio

(impiden que el líquido hierva demasiado rápido) en una placa calefactora. A medida que los vapores fueron ascendiendo por la columna pasaron al condensador que los enfrió y condensó obteniendo así el bioetanol destilado (Figura 4.10).

Determinación de grados brix

La evaluación del grado de alcohol probable en la muestra se realizó mediante la cuantificación de grados brix en el sobrenadante final, utilizando un refractómetro de Abbe.

Cálculo de coeficiente autoamilolítico (AAQ):

Para el cálculo del coeficiente autoamilolítico se utilizó la siguiente fórmula:

$$AAQ = \frac{\text{Rendimiento de etanol [ml/ kg MS] sin enzimas técnicas}}{\text{Rendimiento de etanol [ml/ kg MS] con enzimas técnicas}} * 100$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los caracteres fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANAVA) combinado, mediante modelos lineales generales y mixtos. La producción de bioetanol y grados brix se consideró el factor genotipo, agregado o no de enzima, y germinado o no de grano como efecto fijo; el coeficiente autoamilolítico se analizó el factor genotipo y germinado o no como efectos fijos; mientras que el resto de los caracteres se analizó el factor genotipo como efecto fijo. En todos los análisis combinados las repeticiones se consideraron como efecto aleatorio. Cuando el ANAVA fue significativo ($p < 0.05$), se utilizó la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD). Los análisis de correlación se realizaron con los valores promedios de cada genotipo. Para los análisis se utilizó el programa InfoStat (Di Rienzo et al., 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Humedad

El contenido de humedad de grano fue similar en todos los genotipos de triticale, sin diferencias estadísticas ($p= 0.95$) (Tabla 5). Los resultados de este estudio resultaron inferiores a los informados por Manley et al., (2013), que trabajando con mediciones directas y con espectroscopía del infrarrojo cercano (NIR) obtuvieron valores medios de 11.22 % en ambos casos; Peijin et al., (2015) de 11.44 %; Madet & Bayazitova et al., (2021) de 11.34 a 13.51 % y Guzmán-Ortiz et al., (2018) de 11.22 a 12.02 %; mientras que Vucurovic & Pejin et al., (2007) informaron valores de humedad del grano de triticale de 9.50 %. En este sentido, Guzmán-Ortiz et al., (2018) expresan que el contenido de humedad tiene el potencial de afectar la calidad del grano, así como la capacidad germinativa. El contenido de humedad tiene relevancia en cuanto al almacenamiento seguro y prolongado del grano (Vucurovic & Pejin et al., (2007), porque los contenidos de humedad mayores a 13-14% favorecen el daño que causa la presencia de microorganismos y puede afectar la calidad de las harinas en la fabricación de productos alimenticios. Además, un bajo porcentaje de humedad en grano es favorable durante el almacenamiento para evitar la actividad de enzimas involucradas en la germinación, ya que el triticale tiene tendencia a la germinación de precosecha y a producir elevados niveles de actividad de la enzima alfa amilasa Mellado et al., (2008), condición requerida durante el proceso de malteado y no previamente.

Cenizas

El análisis de la varianza arrojó diferencias significativas entre genotipos ($p=0.04$), siendo el genotipo CIM 826, el de menor contenido de cenizas en grano respecto al resto de los genotipos. Los valores de ceniza en grano mostraron un rango de 1.791 % a 2.126 % (Tabla 3) y fueron similares a los reportados en la bibliografía (Guzmán-Ortiz et al., 2018;

Manley et al., 2013). Guzmán-Ortíz et al., (2018) no encontraron diferencias significativas en el contenido de cenizas en genotipos de triticale (1.68 - 2.133%) al igual que Manley et al., (2013) quienes informaron un valor medio de cenizas de 1.83% (rango 1.35 - 2.34%) y Madet & Bayazitova et al., (2021) un valor de cenizas entre 1.62% y 2.02 %.

El contenido de cenizas permite clasificar a las harinas en función del contenido de salvado que contienen. El salvado está formado por el pericarpio, la capa de aleurona, la epidermis nuclear y la testa; y dada su composición química, contiene una elevada proporción de minerales y de fibras (Hoseney et al., 1994). En este sentido, Vucurovic & Pejin et al., (2007) informaron que un valor promedio de 2% de cenizas en grano de triticale, es un valor adecuado, representando la fuente mineral necesaria para la correcta actividad de la levadura durante la fermentación.

Tabla 3: Datos obtenidos en el análisis proximal realizado a las líneas experimentales de triticale

Genotipos	Humedad grano (%)	Humedad harina (%)	Ceniza grano (g)	Ceniza harina (g)	Proteína (%)	FN (s)	Almidón %
Espiga c.	10.37	15.03	2.006	0.695	11.03	286.67	47.3
CIM 3/75	10.5	15.03	2.003	0.612	11.53	242.33	53.9
CIM 820	10.47	15	2.022	0.668	12.03	236.67	51.23
CIM 826	10.5	15.18	1.841	0.647	12.23	306.33	49.96
CIM 829	10.37	15	1.901	0.661	9.53	287	47.8
CIM 830	10.33	14.88	2.019	0.597	12.03	263.67	67.07

Proteína

Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ($p=0,01$), siendo la línea CIM 829 la que presentó la menor concentración de proteínas (Tabla 4). El rango estuvo comprendido entre 9.2 y 13.4 % (Tabla 3), muy similar a lo informado por Kučerová et al., (2007), 9.10-13.05 %; Pejin et al., (2009), 9.12-10.5 %; McKenzie et al., (2014), 9.0

%; Peijin et al., (2015), 11.60%, Aufhammer et al., (1996), 13.9 % y Madet & Bayazitova et al., (2021), 10.53-13.47 %. Por su parte otros autores reportaron valores mayores como Macri et al., (1986a), 10.9-14.4 %; Pol-Szyszkó & Podsiadło et al., (2021), 11.12-14.45 %; García Ramírez et al., (2023), 9.15-16.61 % y Rodríguez Perez et al., (2023), 9.15-15.54 %.

Fleischer & Senn et al., (2005) informaron que el rendimiento del etanol depende de propiedades del cereal como el contenido de almidón y de proteína. Según Pol-Szyszkó & Podsiadło et al., (2021) el triticale contiene un contenido de proteínas adecuado que facilita el proceso de producción de bioetanol. Contenidos muy altos de proteína dificultan el proceso de producción de bioetanol. Altos contenidos de lisina y arginina retardan el crecimiento de las células de la levadura, lo que hace que el tiempo de fermentación sea más largo. Esto es apoyado por Aufhammer et al., (1996), Kučerová et al., (2007) y du Toit et al., (2019) quienes afirman que el rendimiento de etanol se ve reducido por el contenido de proteína, que usualmente reporta una correlación negativa con el almidón. En este estudio, el contenido de proteína no arrojó asociación con el rendimiento de bioetanol ($R^2 = 0.07$, $p = 0.76$ para el tratamiento con enzimas; y $R^2 = 0.36$, $p = 0.14$ para el tratamiento sin enzimas).

Almidón

El triticale presenta un contenido de almidón similar a los demás cereales, sin embargo, los tipos de gránulos presentes en el almidón pueden variar debido a los genotipos, lo cual puede ser más aprovechable en la biotecnología de materiales. Según Peña (2004), el contenido de almidón en triticale (53 % - 63 %), es menor que en el trigo (58 - 62 %) pero mayor que en el centeno (54.5 %), aunque no es significativo. En este trabajo los genotipos analizados presentaron contenido promedio de almidón entre 47.3 (Espiga cuadrada) y 67.07% (CIM 830), encontrándose diferencias significativas entre los

genotipos ($p=0.04$). Los mismos genotipos utilizados fueron previamente evaluados en el laboratorio de Química de la Facultad de Agronomía, UNLPam, reportándose en ese momento valores 52.91 % - 66.88 % en triticale y hasta 67.15 % en tricepiro (2018, datos no publicados). Estos datos son coincidentes con los encontrados en la bibliografía. Choi et al., (2008) reportaron un contenido de almidón en triticale de 65.69 a 67.48%; Peijin et al., (2009) reportaron 66.45 a 67.92%, Peijin et al., (2015) 66% y Madet & Bayazitova et al., (2021) 56.43 a 76.13%.

Acorde a du Toit et al., (2019), en general, las materias primas con un alto contenido de almidón generan altos rendimientos de etanol después de la fermentación. En nuestro caso no se encontró relación entre el contenido de almidón y la producción de bioetanol ($R^2 = 0.19$; $p = 0.4458$ para el tratamiento con enzimas y $R^2 = -0.11$; $p = 0.6608$ para el tratamiento sin enzimas).

Falling Number

Hubo diferencia significativa ($p<0.01$) entre los genotipos. Los valores de *Falling Number* estuvieron comprendidos entre 216 y 320 s, con un valor promedio de 270.44 s, lo que indicaría, según la escala propuesta para harina de trigo, que los genotipos estudiados presentan actividad amilásica de normal a débil. Esto puede deberse a las condiciones ambientales no predisponentes para la presencia de grano brotado y a condiciones de almacenamiento previas al ensayo de fermentación. Estos valores son inferiores a los reportados por Picca et al., (2021) 92 a 432 s pero superiores al resto de la bibliografía: Aufhammer et al., (1996) 75 s; Macri et al., (1986a) 62-160 s; Kučerová et al., (2007) 64.03-107.2 s, Peijin et al., (2015) 66 s y Pol-Szyszko & Podsiadło et al., (2021) 62.92-294.83 s.

Tabla 4: Valores medios de caracteres asociados a la producción de bioetanol en triticales evaluados en la temporada 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

Genotipo	Humedad G (%)	Humedad H%	Ceniza G	Ceniza H	Proteína	bioetanol C/E	bioetanol S/E	FN
CIM 3/75	10.5	15.18	2.0 a	0.61	11.53 a	444.2	427.0	242.3 cd
CIM 820	10.5	15.03	1.99 a	0.67	12.03 a	499.9	457.5	236.7 d
CIM 826	10.5	15.00	1.84 b	0.65	12.23 a	463.2	387.6	306.3 a
CIM 829	10.4	15.00	1.9 ab	0.66	9.53 b	466.9	445.9	287.0 ab
CIM 830	10.3	14.88	2.02 a	0.60	12.03 a	510.2	411.3	263.7 bc
cuadrada	10.4	15.03	2.01 a	0.70	11.03 a	429.0	415.9	286.7 ab

Letra distinta en la misma columna indica diferencias ($p < 0,05$)

Tabla 5: Análisis de la varianza de caracteres asociados a la producción de bioetanol en triticales evaluados en la temporada 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Entre paréntesis se indica el nivel de significancia de cada factor.

FV	Humedad grano (%)	Humedad harina (%)	Ceniza grano (%)	Ceniza harina (%)	Proteína (%)	FN (s)	Almidón (%)
Genotipo	0.02 (0.95)	0.03 (0.46)	0.02 (0.04)	0.004 (1.07)	4.76 (0.01)	2281.4 (< 0.01)	162.2 (0.04)
Repetición	0.003 (0.95)	0.05 (0.18)	0.003 (0.42)	0.003 (1.05)	0.05 (0.94)	402.8 (0.20)	100.4 (0.17)
Error	0.09	0.03	0.004	0.003	0.65	211.7	47.97
CV	2.81	1.09	3.39	9.44	7.06	5.38	13.1

Bioetanol

La producción de bioetanol, de acuerdo con el análisis de la varianza, presentó diferencias significativas entre los genotipos ($p = 0.02$) y entre los tratamientos con y sin agregado de enzimas ($p = 0.02$) (Tabla 8). El genotipo de mayor producción de bioetanol fue CIM 820, con una media de $484.3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ MS}$, seguido por CIM 830 ($469.85 \text{ ml kg}^{-1} \text{ MS}$) y CIM 826 ($458.7 \text{ ml kg}^{-1} \text{ MS}$). Los genotipos con menor producción fueron Espiga cuadrada y CIM 3/75 con medias de 418.2 y $418.5 \text{ ml kg}^{-1} \text{ MS}$ respectivamente.

La producción de bioetanol en el tratamiento de grano sin germinar y con agregado de enzimas, el rango estuvo comprendido entre 336.73 a 590.97 ml kg⁻¹ MS, y presentó mayor amplitud que el de Kučerová et al., (2007) quienes informaron un rango de 393.5 a 416.80 ml kg⁻¹ MS. En cuanto a los valores medios similares a los de este estudio destacan los obtenidos por Aufhammer et al., (1996) 443 ml kg⁻¹ MS, Choi et al., (2008) 410.9 ml kg⁻¹ MS y Peijin et al., (2009) 470.88 a 482.15 ml kg⁻¹ MS.

En el tratamiento de grano sin germinar y sin agregado de enzima alfa amilasa, los valores de producción de bioetanol estuvieron comprendidos entre 310.62 a 490.67 ml kg⁻¹ MS, un rango más amplio que el informado por Peijin et al., (2009) de 454.10 a 474.01 ml kg⁻¹ MS. El valor medio de 400.64 ml kg⁻¹ MS fue superior al informado por Choi et al., (2008) de 342.2 ml kg⁻¹ MS y similar a la media de 428 ml kg⁻¹ MS informada por Aufhammer et al., (1996).

Tabla 6: Rendimiento de bioetanol, grados brix y coeficiente autoamilolítico (AAQ) de las líneas experimentales de triticale analizadas en granos germinados y sin germinar, con y sin el agregado de enzima alfa amilasa

Genotipos	Sin germinar					Germinado				
	Con alfa amilasa		Sin alfa amilasa		AAQ	Con alfa amilasa		Sin alfa amilasa		AAQ
	ml ETOH/kg MS	Grados brix	ml ETOH/kg MS	Grados brix		ml ETOH/kg MS	Grados brix	ml ETOH/kg MS	Grados brix	
Espiga c.	429.03	7.4	415.93	6.6	96.99	402.23	7.47	425.52	6.67	108.89
CIM 3/75	444.2	8.23	427.01	6.5	101.89	388.27	7.23	414.49	6.8	111.07
CIM 820	499.90	7.17	457.33	6.6	88.96	523.02	7.6	456.72	6.8	89.2
CIM 826	463.24	7.27	387.66	6.5	83.79	543.05	7	440.81	7.07	81.4
CIM 829	466.9	6.97	445.89	6.7	98.56	425.56	7.47	409.37	6.83	97.07
CIM 830	510.21	6.9	411.3	6.7	82.55	465.14	7.53	492.73	7	105.94

Tabla 7: Cuadrados medios de la producción de bioetanol (ETOH) y grado brix en genotipos probados durante 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Entre paréntesis se indica el nivel de significancia de cada factor.

Factor de variación	GL	ml ETOH/kg MS	Grados brix
Genotipos	5	9096 (0.02)	0.077 (0.98)
repetición	2	4469 (0.24)	5.943 (<0.001)
germinado	1	98.2 (0.85)	0.534 (0.37)
enzimas	1	17650 (0.02)	7.220 (0.002)
G*Ger	5	4562 (0.21)	0.238 (0.87)
G*E	5	3980 (0.28)	0.254 (0.86)
Ger*E	1	3228 (0.31)	0.222 (0.56)
G*Ger*E	5	2434 (0.56)	0.377 (0.73)
Error	46	2434	0.676
CV		12.41	11.68

GL, grados de libertad

G, Genotipo; R, repetición; Ger, germinación; E, enzimas;

CV, coeficiente de variación

El tratamiento de granos germinados, no arrojó diferencias estadísticas con el tratamiento de granos sin germinar, ($p= 0.85$, Tabla 8) con rangos comprendidos entre 285.62 a 579.30 ml kg⁻¹ MS para el tratamiento con agregado de enzimas, y 344.55 a 500.58 ml kg⁻¹ MS sin agregado de enzimas. En la Figura 5 se observa que los genotipos CIM 820 y CIM 826, son los únicos que en el tratamiento germinado, destacaron con una producción de bioetanol mayor al resto de los tratamientos. Esto se contradice con la bibliografía en la que se menciona que el proceso de germinado en determinadas condiciones asegura la máxima acumulación de enzimas hidrolíticas (Bayazitova et al., 2021). Una posible explicación es que estos autores proponen como condiciones ideales remojar los granos hasta un contenido de humedad de 44% y un proceso de germinación de cinco días a temperatura de 16°C, condiciones de germinación que no fueron las utilizadas en este trabajo (ver pág 18). Kádár et al., (2011) acuerdan que la germinación puede ser utilizada para la producción de bioetanol debido al aumento de la producción *in situ* de enzimas, pero el resultado es fuertemente dependiente del tratamiento realizado.

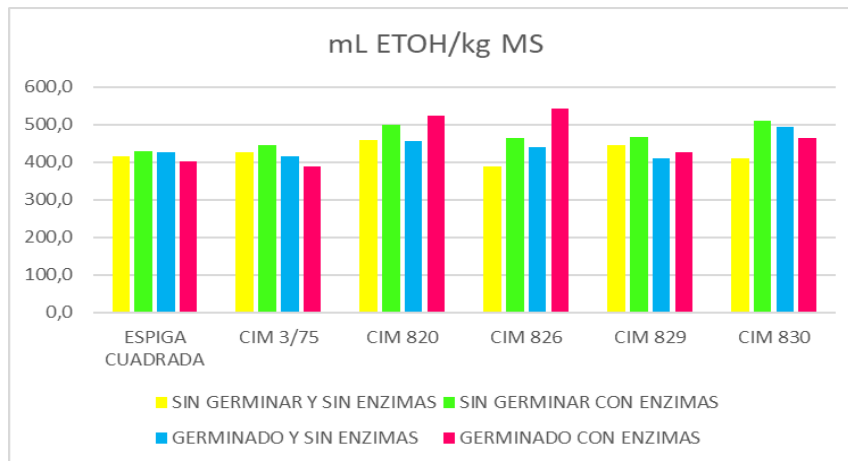


Figura 5: Producción de bioetanol ($\text{ml ETOH kg}^{-1} \text{MS}$) de los seis genotipos analizados bajo los cuatro tratamientos realizados

Si bien no existen diferencias estadísticas ($p= 0.31$) entre el agregado de enzimas y la germinación de los granos, hay una tendencia de mayor producción de bioetanol en los granos germinados sin el agregado de enzima que en los no germinados en la misma condición. Esta tendencia se revierte con el agregado de alfa amilasa (Figura 6). Los granos germinados con agregado de enzimas producen menos bioetanol que los no germinados con el agregado de enzimas. En el caso del tratamiento de granos germinados con agregado de enzima, se produce una inhibición de la actividad amilásica total, por falta de sustrato o por acumulación de producto, tal a lo informado por Azad et al., (2014), quienes trabajando en papa concluyeron que el agregado en exceso de enzima alfa amilasa en el proceso de fermentación generó una inhibición por retroalimentación que resultó en una menor cantidad de sustrato convertido a etanol. También es coincidente con Aranda Carballo et al., (2019) que evaluaron la producción de etanol en pomarrosa y encontraron la mayor producción de etanol en los tratamientos con menor concentración de sustrato inicial evaluadas, demostrando que concentraciones de sustrato más altas no están asociadas a mayor cantidad de etanol, lo que se debe principalmente por la presión osmótica en el medio, como efecto de la concentración de sólidos solubles, lo cual

interfiere con el metabolismo de la levadura. Autores como du Toit et al., (2009) concluyen que en las etapas de licuefacción y sacarificación, procesos que involucran a las enzimas alfa amilasa y glucoamilasa respectivamente, las enzimas trabajan en forma cooperativa por lo que se requiere una dosis óptima de cada una de ellas para conseguir la hidrólisis completa del almidón.

En la Figura 7 se observa que el tratamiento de granos germinados con agregado de enzima presentó la mayor producción diaria a las 48 hs del inicio de la producción, respecto del resto de los tratamientos. El pico de producción de bioetanol a las 48 horas se diferenció del resto de los tratamientos, que en general retrasaron su pico de producción hasta las 72 horas. Esta misma situación fue informada por Yan et al., (2010) quienes trabajando con sorgo germinado encontraron que el proceso de fermentación se completó dentro de las 36 h, varias horas antes que el control no germinado, lo que indica que el uso de granos de sorgo germinados para la producción de etanol podría acortar el tiempo de fermentación sin disminuir significativamente el rendimiento de etanol.

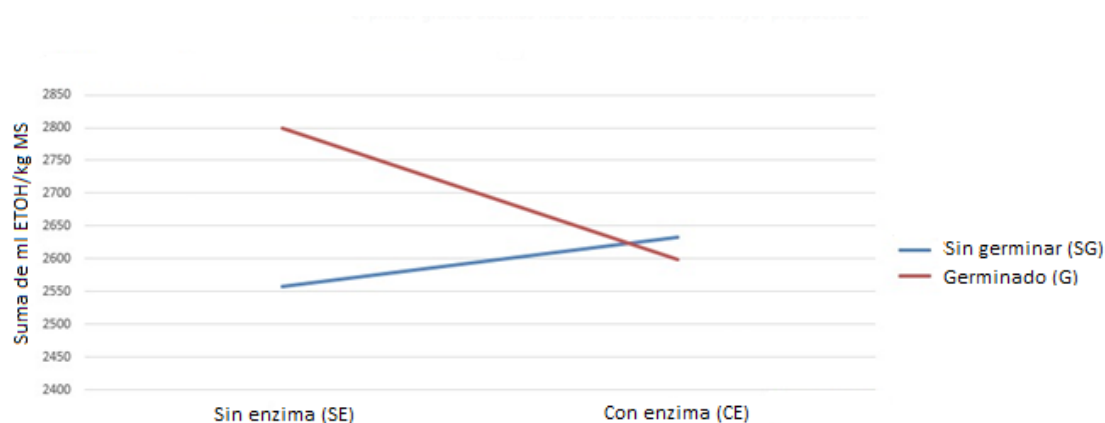


Figura 6: Producción de bioetanol ($ml\ ETHO.kg^{-1}\ MS$) para los tratamientos germinados y sin germinar en función del agregado de enzimas

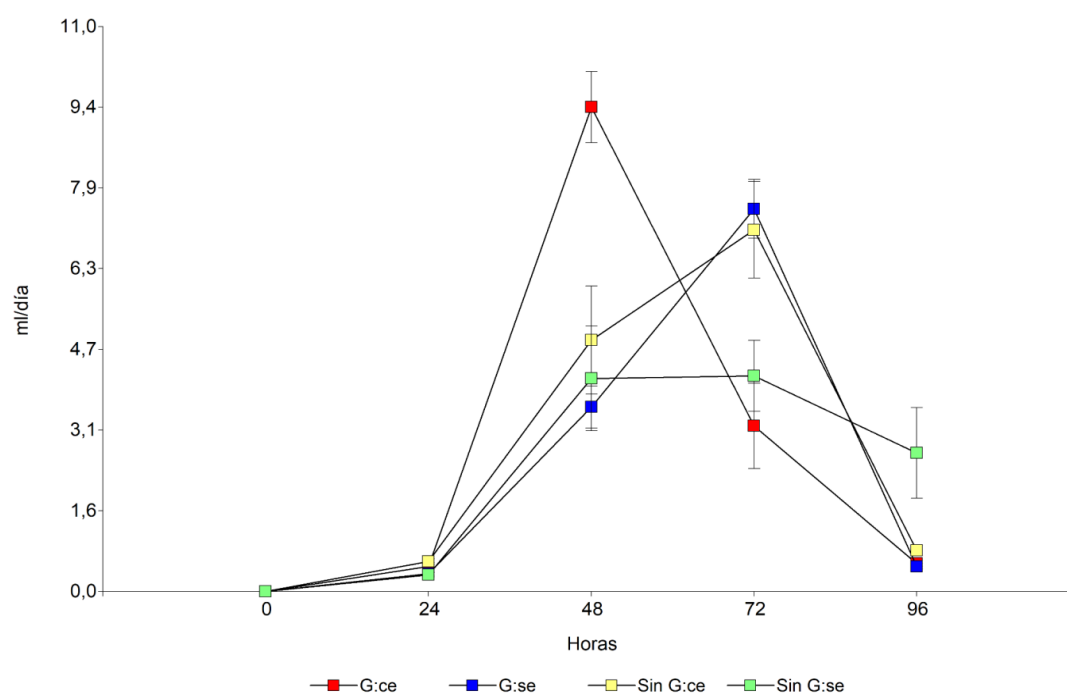


Figura 7: Producción de bioetanol diario (ml día^{-1}) para los cuatro tratamientos (G:ce: germinado con enzima; G:se: germinado sin enzima; Sin G:ce: sin germinar con enzima; Sin G:se: sin germinar sin enzima)

Coeficiente autoamilolítico (AAQ)

El coeficiente autoamilolítico es importante para optimizar la dosis de enzimas necesaria para la degradación y sacarificación del almidón del grano. A mayor coeficiente autoamilolítico menor será la cantidad de enzimas técnicas que sea necesario adicionar disminuyendo así los costos generales de producción de bioetanol. El rango de AAQ en los genotipos fue de 82.55 % a 101.89 %, con una media de 92.12 % para el tratamiento de granos sin germinar; y de 81.4 % a 111,07 %, con una media de 98.93 % para el tratamiento de granos germinados (Tabla 6). Estos valores medios coinciden con los presentados por Vučurović & Pejin et al., (2007) quienes informaron que las enzimas amilolíticas nativas del triticale podían degradar entre el 80 y 90 % del almidón disponible, de Pejin et al., (2009), quienes obtuvieron valores de AAQ entre 94.24 y 99.30 % y Aufhammer et al., (1996) que presentaron valores de AAQ de 96.6 % en triticale, 99.5 % en centeno y 86.4 % en trigo. El AAQ de la harina de granos germinados

fue mayor en 7 % que el de harina de granos sin germinar aunque esto no representó una diferencia estadística significativa ($p= 0.12$; Tabla 8). Kádár et al., (2011) informaron que utilizando enzimas endógenas que se producen durante la germinación de semillas de centeno y trigo, lograron incrementar significativamente los valores para centeno, obteniendo AAQ mayores al 90 %. Por el contrario, trabajando con granos de trigo germinados los valores reportados fueron del 76 %.

Tabla 8: Cuadrados medios del Coeficiente autoamilolítico (AAQ) en genotipos probados durante 2021 en Santa Rosa, La Pampa, Argentina. Entre paréntesis se indica el nivel de significancia de cada factor.

	Gl	AAQ
Genotipo	5	611.7 (0.05)
repetición	2	1050.1 (0.02)
germinado	1	626.2 (0.12)
Genotipo*germinado	5	185.4 (0.57)
Error	22	238.59
CV		16.04

Grados Brix

Los grados Brix dan una idea de la concentración de azúcares fermentables disponibles en el mosto final, de manera que los grados Brix disminuyen a medida que las levaduras utilizan los azúcares fermentables para llevar a cabo la fermentación alcohólica. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los tratamientos con enzimas y sin enzimas ($p= 0.002$) y no encontró diferencia entre los tratamientos germinado y sin germinar ($p= 0.37$) (Tabla 8). Los valores obtenidos en el sobrenadante final presentaron una media de 7.32 grados Brix para el tratamiento sin germinar con enzima y 6.6 grados brix para el tratamiento sin germinar sin enzima. Con respecto a los tratamientos germinados, las medias fueron de 7.38 y 6.86 grados brix para con enzima y sin enzima, respectivamente. Estos valores son similares a lo informado por Beltrán & Comba (2012) para mostos finales de maíz y por Barletta et al., (2012) y Picca et al., (2019) para sorgo.

Los valores de grados Brix finales reflejan el status de azúcares fermentables remanentes después del proceso de cinco días de fermentación en este ensayo. En los tratamientos con agregado de enzimas teóricamente hay más sustrato, más azúcares fermentables disponibles para el proceso de la fermentación. La levadura consume rápidamente los azúcares disponibles en los primeros días, se acumula el bioetanol y genera una inhibición del crecimiento, quedando un remanente de sustrato. La elevada concentración inicial de sustrato puede ejercer un efecto inhibitor de la fermentación, ya que esto puede estar relacionado con la sobreproducción de etanol (Aguilar Uscanga et al., 2000; Suárez-Macachín et al., 2016; Wiratno et al., 2014). Esto se ve reflejado en la caída de producción de etanol al final del proceso, que se corresponde con las 96 horas, siendo el pico de producción entre las 48 y 72 horas (Figura 7).

Tabla 9: Comparación de medias entre los distintos genotipos de triticale probados durante el año 2021 para la producción de bioetanol y grados brix.

		ml	Grados brix
		ETOH/kg	
		MS	
Genotipos	CIM 3/75	418.49 c	7.18
	CIM 820	484.3 a	7.04
	CIM 826	458.7 abc	6.95
	CIM 829	436.95 bc	6.98
	CIM 830	469.85 ab	7.03
	Espiga cuadrada	418.2 c	7.03
DMS		45.6	0.67
Enzimas	Si	463.41 a	7.35 a
	No	432.09 b	6.72 b
DMS		26.37	0.39

DMS: Diferencia significativa. Distinta letra en la misma columna indican diferencias ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos coinciden con la bibliografía existente en cuanto a la variabilidad genética en la producción de bioetanol y la alta capacidad autoamilolítica endógena del triticale. Sin embargo, las diferencias observadas entre los genotipos en relación a la producción de bioetanol, no pudieron asociarse con las propiedades químicas analizadas como el contenido de almidón, o el contenido de proteína del grano.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que el agregado de enzima exógena aumenta la producción de bioetanol; aunque esta diferencia no se evidenció cuando el contenido de amilasas aumenta debido a la germinación de los granos.

Si bien el tratamiento de germinación de los granos no se tradujo en un aumento de la producción de bioetanol como se esperaba, podemos decir que, en combinación con el agregado de enzima exógena, genera un adelanto del pico de producción de 24 horas en relación a los demás tratamientos. Esto es muy interesante, ya que acorta los tiempos de producción de bioetanol, permitiendo optimizar la producción.

El efecto sinérgico de la germinación del grano de triticale y el agregado de enzima permite sugerir la posibilidad de evaluar otras condiciones de germinación, así como modificar la cantidad de sustrato y de enzima inicial.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la empresa Porta Hnos. S.A. y muy especialmente a la Ing. Nadia Comba, por proveernos gentilmente de las enzimas alfa amilasa, glucoamilasa y levaduras utilizadas en este trabajo.

Quiero agradecer a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa por mi experiencia educativa, donde no solo me han proporcionado una educación de calidad, sino que también me ha inculcado valores de dedicación, perseverancia y compromiso. Han sido años transformadores y estoy profundamente agradecida por la oportunidad de formar parte de esta comunidad académica excepcional, los llevaré siempre en mi corazón.

En particular a Aurora, Adriana y Mirta, docentes de la Facultad de Agronomía, quienes fueron un pilar fundamental para este proyecto. Quiero expresar mi gratitud hacia ellas, cuya colaboración y aportes han sido invaluable. Sus experiencias y opiniones han enriquecido a este trabajo y han contribuido significativamente a su calidad.

Un profundo agradecimiento a mi familia por su amor incondicional, apoyo constante y por creer en mí desde el principio. A mis amigos y compañeros de estudio, quienes han estado a mi lado en las buenas y en las malas, les agradezco por sus palabras de aliento y por compartir risas y momentos que aligeraron mi camino.

No puedo dejar de mencionar a una persona muy especial para mí, mi abuelo, tus palabras de sabiduría y tus historias de vida me enseñaron el valor del esfuerzo, la perseverancia y el amor por el conocimiento. Gracias por ser mi guía, mi ejemplo y mi motivación. Tu memoria vivirá en cada logro que alcance, tu presencia perdura en cada rincón de mi vida, y en este agradecimiento, quiero honrar la huella que dejaste en mí.

BIBLIOGRAFÍA

- Alegre M., Copia P. 2010. Biocombustibles: Bioetanol. INTA Informa. <http://inta.gob.ar/documentos/biocombustibles-bioetanol>
- Alegre M., Copia P., Giorda L.M. 2012. Sorgo granífero, fuente potencial para la producción de etanol en Argentina. Reuniones y Congresos: resúmenes y trabajos presentados. Ediciones INTA. ISSN on line 1851-4987
- Aranda, Jorge & Garcia, lizeth & F., Javier & Muñoz, Luis Gilberto. (2019). Análisis del potencial de azúcares fermentables en pomarroza (*Syzygium Malaccense*) para la producción de etanol.
- Aufhammer, W., Pieper, H. J., Kasser, J., Schafer, V., Senn, T. and Kubler, E. 1996. The suitability of grains from cereal crops with different N supply for bioethanol production, *J. of Agron. and Crop Sci.*, 177(3), 185–196.
- Azad, A. , Yesmin, N. , Sarker, S. , Sattar, A. and Karim, R. (2014) Optimum Conditions for Bioethanol Production from Potato of Bangladesh. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 501-507. doi: 10.4236/abb.2014.56060.
- Badiali O., Maich R. 2013. Bioetanol, un nicho para el triticale. *La Voz del Interior*, <http://www.lavoz.com.ar/suplementos/-voz-campo>
- Balat, M. 2010. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Convers Manage*, Vol. 52(2): 858-875
- Barletta, A. L., Sánchez, Y. I. & Valazza y L. A. (2012). Obtención de bioetanol a partir de la fermentación del sorgo. 5ª Jornadas de Ciencia y Tecnología de la Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Villa María. Córdoba, Argentina. Recuperado de http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytaal_frm/CyTAL_2012/TF/TF029.pdf

- Bayazitova M., Kekibaeva A., Baigazyeva G., Askarebekov E., Zhamalova D. 2021. Analysis of the accumulation of amylolytic enzymes in triticale grain during malting process. Eastern European Journal of Enterprise Technologies. ISSN 1729-3774
- Bedón Gómez M., Nolasco Cárdenas O., Santa Cruz Carpio C. y Gutiérrez Román A. (2013) Purificación Parcial y Caracterización de Alfa Amilasa de granos germinados de *Chenopodium quinoa* (Quinoa). Revista ECIPerú Vol 10 (1).
- Beltrán, R. A. y Comba, N. Z. (2012). Rendimientos de bioetanol en fermentaciones realizadas con mostos de alta concentración de sólidos. 5ª Jornadas de Ciencia y Tecnología de la Facultad Regional Villa María, Universidad Tecnológica Nacional, Villa María. Córdoba, Argentina. Recuperado de www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frmv/CyTAL_2012/.../TF004.pdf
- Bioetanol Rio Cuarto S.A www.bio4.com.ar
- Castaño, H. I. y Mejía, C. E. 2008. Producción de etanol a partir de almidón de Yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación – fermentación simultánea (SSF). VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN 0121-4004 Vol 15 (2) pag 251-258
- Choi G., Kim Y., Moon S. 2008. Bioethanol production using endogenous triticale enzyme. Korean J. Biotechnol. Bioeng. Vol 23, N°6:504-508.
- Chuck-Hernández C., Pérez-Carillo E., Heredia-Olea E., Serna-Saldívar, S.O. 2011. Sorgo como un cultivo multifacético para la producción de bioetanol en México: Tecnologías, avances, y áreas de oportunidad. Revista Mexicana de Ingeniería Química, Vol 10 (3), 529-549
- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M. & Robledo C. (2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

- du Toit L. 2019. Triticale grain fermentation for production of bioethanol and animal feed. Thesis for the Degree of Master of engineering (Chemical engineering) Faculty of Engineering at Stellenbosch University. Recuperado de <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/106091>
- FAOSTAT (2020) Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/>
- Finola R.A y Torres J.J. 2022. Biocombustibles en la región pampeana argentina. Contexto de desarrollo y actores. En: Dinámicas territoriales en América Latina. La necesidad de repensar y proponer una nueva agenda de desarrollo regional posneoliberal. 1 Ed. Hernandez J.L., Civitaresi H.M. y Lima da Silveira R.L. (comps). UniRío Editora, Río Cuarto. ISBN 978-987-688-510-2
- Fleischer, S. & Senn, T. 2005. Regional plants - Their potential for sustainable ethanol production, their ecobalance and the effects of cereal properties on ethanol yields. Zuckerindustrie. 130. 773-777.
- García Ramírez, A; Rodríguez Pérez, G.; Reynaga Franco, F.; Cervantes Ortiz, F. 2023. Composición nutricional en granos de triticales (X. Triticosecale Wittmack) y usos alimentarios. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Vol XXV (2)44-51
- García-Aparicio M., Trollope K., Tyhoda L., Diedericks D., Gorgens J. 2011. Evaluation of triticale bran as raw material for bioethanol production. Fuel, 90: 1638-1644
- Goldemberg J, Mello FFC, Cerri CEP, Davies CA, Cerri CC. 2014. Meeting the global demand for biofuels in 2021 through sustainable land use change policy. Energy Policy; 69:14–18.
- Guzmán-Ortíz, F. A., Figueroa-Cárdenas, J. D., Guadarramal-Lezama, A. Y., Ambriz-Vidal, T. N., Román-Gutiérrez, A. D., Ronquillo-de Jesús, E. a., y López-Perea, P. 2018. Characterization and evaluation of modern Triticale (X Triticosecale Wittmack) lines for

- malt production and craft beer brewing. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(3), 885-896.
- Hagberg, S. (1960). A rapid method for determining alpha amylase activity. *Cereal Chemistry*, 37, 218222.
- Hoseney, R. C. (1994). *Principles of Cereal Science and Technology*, 2nd edn., American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, MN, USA.
- INASE 2003, 2005, 2006, 2008, 2010, 2011 Producción de semilla fiscalizada. Boletines del Instituto Nacional de Semillas, MAGyP, B. Aires
- INASE 2018: Recuperado de [Datos Argentina - Producción nacional fiscalizada por especies registrada en el INASE entre el período 2017 y 2018](#)
- INASE 2021: Recuperado de https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inase_produccion_nacional_2021.pdf
- Kádár, Z.; Christensen A. D.; Thomsen, M. H.; Bjerre, A. B. 2011 Bioethanol production by inherent enzymes from rye and wheat with addition of organic farming cheese whey. *Fuel* 90(11): 3323-3329
- Kossatz H.L., S.H. Rose, M. Viljoen-Bloom, W.H. van Zyl. 2017. Production of ethanol from steam exploded triticale straw in a simultaneous saccharification and fermentation process *Process Biochemistry* 53: 10–16
- Kučerová, J. 2006. Usability of triticale into bioethanol producing through the use of technical enzymes. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. 54. 33-38. 10.11118/actaun200654040033.
- Kučerová, J. 2007. The Effect of Year, Site and Variety on the Quality Characteristics and Bioethanol Yield of Winter Triticale. *J. Inst. Brew.* 113 (2) (2007) 142–146. 10.1002/j.2050-0416.2007.tb00270.x.

- Lonbani M, Arzani A. 2011. Morpho-physiological traits associated with terminal drought stress tolerance in triticale and wheat. *Agron Res* 9 (1-2):315-329
- Macri, L. J., Balance, G. M. & Larter, E. N. 1986 (b). Changes in the alpha amylase and protease activities of four secondary hexaploid triticales during kernel development. *Cereal Chemistry*, 63(3), 267-270.
- Macri, L. J., Balance, G. M. & Larter, E. N. 1986(a). Factors affecting the breadmaking potential of four secondary hexaploid triticales. *Cereal chem* 63(3), 263-267
- Madet, G. & Bayazitova, M. M. (2021) Research of malting properties of Kazakhstan grain varieties for use in the beverage industry. *Series chemistry and Technology*. 447(3):59-65 DOI: 10.32014/2021.2518-1491.51
- Manley M., McGoverin C., Snyders F., Muller N., Botes W., Fox G. 2013. Prediction of Triticale Grain Quality Properties, Based on Both Chemical and Indirectly Measured Reference Methods, Using Near-Infrared Spectroscopy. *Cereal Chem.* 90(6):540-545
- McGoverin, C. M., Snyders, F., Muller, N., Botes, W., Fox, G., Manley, M. 2011. A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *Journal of the Science of Food Agriculture, Forestry and Fisheries.*, 91, 1155-1165.
- McKenzie, R. H., Bremer, E., Middleton, A. B., Beres, B., Yoder, C., Hietamaa, C., Pfiffner, P., Kereliuk, G., Pauly, D. and Henriquez, B. 2014. Agronomic practices for bioethanol production from spring triticale in Alberta. *Can. J. Plant Sci.* 94:15-22.
- Mellado, M.Z.; Matus, I.T. & Madariaga, R.B. (2008). Antecedentes sobre el triticale, en Chile y otros países. Chillán, Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Boletín INIA N° 183, pp74. Recuperado de http://biblioteca.inia.cl/link.cgi/catalogo/boletines/antecedentes_sobre_el_triticale_en_chile_y_otros_paises.act
- Mergoum M., W. Pfeiffer, R. Peña, K. Ammar, and S. Rajaram. 2004. Triticale Crop Improvement: The CIMMYT Programme. p. 11-22. In Mergoum, M. and H. Gómez

- Macpherson (eds.) *Triticale Improvement and Production*. Plant Production and Protection Paper 179. FAO, Rome, Italy
- Mojovic, L., Pejin, D., Grujic, O., Markov, S., Pejin, S., Rakin, M., Maja Vukasinovic, M., Nikolic, S. and Savic, D. 2009. Progress in the production of bioethanol on starch-based feedstocks. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 15, 4. DOI: 10.2298/CICEQ0904211M
- Munoz-Insa, A., Gastl, M. and Becker, T. 2016. Influence of Malting on the Protein Composition of Triticale (\times Triticosecale Wittmack) 'Trigold'. *CCHEM*, 93: 10-19. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-12-14-0251-R>
- Muralikrishna G., Nirmala, M. (2005) Cereal α -amylases—an overview. *Carbohydrate Polymers*. Vol 60 (2) ISSN 0144-8617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.12.002>.
- Pejin D., Mojovic L.J., Vucurovic V., Pejin J., Dencic S., Rakin M. 2009. Fermentation of wheat and triticale hydrolysates: A comparative study. *Fuel*, 88: 1625-1628
- Pejin J.D., V. Mojovic L, Pejin D.J, Kocic´-Tanackov S.D., . Savic D.S., Nikolic S.B., Djukic´-Vukovic A.P. 2015 Bioethanol production from triticale by simultaneous saccharification and fermentation with magnesium or calcium ions addition. *Fuel* 142:58-64
- Peña, R. J. 2004. Food uses of triticale. In: Gomez-Macpherson, M.M.H. In: *Triticale improvement and production*, FAO plant production and protection paper 179. Rome: FAO.
- Perten, H. 1966. A Colorimetric Method for the Determination of Alpha-Amylase Activity (ICC Method). *Cereal Chemistry*, 43, 336-342
- Picca, A., Ferrari, E., Castaño, M., Pereyra Cardozo, M., Domínguez, R. y Paccapelo, H. (2021). Actividad de alfa amilasas y su relación con el tiempo de caída en líneas experimentales de triticale y tricepiro de uso potencial en la producción de bioetanol. *Semiárida*, 31(1), 35--43

- Pol-Szysko M. & C. Podsiadło. 2021. Assessment of indicator determining the usage level of winter triticale cultivars for bioethanol production. *Ecological Genetics and Genomics*, Vol 21, 100098
- Precedence Reserch. 2022. Bioethanol Market (By Application: Transportation, Alcoholic Beverages, Cosmetics, Pharmaceuticals, Others; By Feedstock: Starch based, Sugar based, Cellulose-based; By Fuel Generation: First generation, Second generation,
- Ramacciotti J.; M. Rampo, J. Sartori y R. H. Maich 2010. Triticale para grano, opción de bajo costo en ambientes con poca agua. *www.redacción la voz del campo*. 02.07.2010
- Rodriguez-Perez, G.; Cervantes-Ortiz, J.; Gámez-Vázquez, A.; Reynaga-Franco, F.; Torres-Velázquez, J.; Avila-Perches, M. 2023. Valor nutritivo de triticale como alternativa en la industria alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol 4 N° 3 pp: 351-362
- Seen T. & Pieper H.J. 2001. The biotechnology of ethanol. Cap I. M. Roehr (Ed). WILEY-VCH, Federal Republic of Germany. ISBN 3-527-30199-2
- Singh, B., Patel, J. A. & Sapra, V. T. (1978). Amylase activity in triticale, X *Triticosecale* Wittmack. *Euphytic*, 27(1), 1925. doi.org/10.1007/BF00039115
- Soil Survey Staff, 2014. Claves para la taxonomía de suelos. Pp. 410
- Souza, D.D., Sbardelotto, A.F., Ziegler, D.R., Marczak, L.D.F., Tessaro, I.C. (2016) Characterization of rice starch and protein obtained by a fast alkaline extraction method. *Food Chemistry*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.03>
- Stefan, E. M. Voicu, G.. Constantin, G. A, Ferdes, M. & Ionescu, M. 2015. Falling number vs liquefaction number in alpha amylase activity estimation for bakery flour. International Symposium ISBINA TEH 2015, Agricultural and Mechanical Engineering, Bucarest, Rumania, 461466. <https://www.researchgate.net/publication/316991028>

- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50(1), 20-28.
- Tester, R. F., Karkalas, J., and Qi, X. 2004. Starch - composition, fine structure and architecture. *J. Cereal Sci.* 39, 151–165. doi: 10.1016/j.jcs.2003.12.001
- Third generation; By Blend: E5, E10, E15 to E70, E75 & E85, Others (E85 to E100)) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2022-2030. Recuperado de <https://www.precedenceresearch.com/bioethanol-market>
- Thomsen, M. H., Tajoacha, N., Wu, C., Hovgaard, S., Houmøller, L. P., Holm-Nielsen, J. B and Thomsen, AB (2007). Bioethanol from Germinated Grains. Poster at: 29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals., Denver, USA, 29/4 – 2/5 2007.
- Trade News. 2023. Producción y ventas récord de bioetanol en 2022. Recuperado de <https://tradenews.com.ar/produccion-y-ventas-record-de-bioetanol-en-2022/>
- Tridge.com. 2023. Producción mundial y principales países productores de Trigo triticale. Recuperado de <https://www.tridge.com/es/intelligences/triticale/production>.
- Tse, T. J.; Wiens, D. J.; Reaney, M. J. T. 2021. Production of Bioethanol—A Review of Factors Affecting Ethanol Yield. *Fermentation* 7, 268. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040268>
- Varughese, G., Pfeiffer, W. H. and Peña, R. J. (1996). Triticale: A successful alternative crop (Part 1). *Cereal Foods World* 41:474-482
- Vučurović V. & D. Pejin. 2007 Production of bioethanol from triticale. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke.* 113 (113)
- Wheeler, E.L. & Ferrel, R.E. 1971. A Method for Phytic Acid Determination in Wheat and Wheat Fractions. *Cereal Chemistry*, 48, 312-320.

- Wiratno, Ekwan N., et al. 2014. Effect of Reducing Sugar and Total Nitrogen to Ethanol Production From Molasses by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Experimental Life Science*, vol. 4, no. 2, 2014, pp. 50-55.
- Yan. S., Wu X., Dahlberg J., Bean S.R., MacRitchie F., Wilson J.D., Wang D. 2010. Properties of field-sprouted sorghum and its performance in ethanol production. *Journal of Cereal Science* 51 (3): 374-380
- Zhu F. 2018 Triticale; nutritional composition and food uses. *Food Chem* 15 (241):468-479
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.009>