Evaluación de enzimas celulasa, hemicelulasa y proteasa para mejorar la eficiencia del proceso de maceración en la molienda húmeda de maíz

Oscar Eduardo Montes Gálvez
Código: 2300666

Director: Aram Joel Panay
Codirector: Nilson Ruiz

Universidad del Valle
Programa de Maestría en Biotecnología
Código de programa: 2182
Cali – Colombia
2025

Tabla de contenido

1. Resumen 4
Palabras Claves 4
2. Abstract 5
Keywords: 5
3. Planteamiento del problema y justificación 6
4. Marco Teórico 9
5. Hipótesis o supuesto 15
6. Objetivos 15
6.1. Objetivo general 15
6.2. Objetivos específicos 15
7. Metodología 16
7.1. Efecto de las enzimas en la dureza del maíz 16
7.2. Dureza de granos de maíz 17
7.3. Preparación de la fibra 17
7.4. Microscopía de la fibra 17
7.5. Proteína retenida en fibra 17
7.6. Perfil amilográfico de almidón 18
7.7. Almidón retenido en fibra 18
7.8. Análisis estadístico 18
8. Resultados y discusión 20
8.1. Efecto de la concentración de SO_2 en la dureza del maíz 20
8.2. Efecto de las enzimas sobre la dureza del maíz 22
8.2.1. Proteasa 22
8.2.2. Celulasa 24
8.2.3. Hemicelulasa 27
8.3. Análisis estructural de la fibra de maíz 29
8.4. Condiciones de proceso para el uso combinado de las enzimas proteasa, celulasa y hemicelulasa en la maceración de maíz 31
8.5. Recuperación de almidón y proteína 32
8.5.1. Almidon 32
8.5.2. Proteína 33
9. Conclusiones 36
10. Bibliografía 37
11. Anexos 40

Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación de las plantas de molienda húmeda de maíz de los miembros del CRA (Corn Refiners Association (CRA), 2023.-a) 6
Figura 2. Composición de la fibra de maíz 8
Figura 3. Estructura del grano de maíz 9
Figura 4. Proceso de molienda húmeda de maíz 10
Figura 5. Estructura cristalina de celulasa Cel5A de Trichoderma reesei (Lee et al. 2011) 12
Figura 6. Estructura cristalina de la hemicelulasa Alpha-L-arabinofuranosidasa (Miyanaga 2004) 12
Figura 7. Estructura modelada mediante AlphaFold de la proteasa bacillolysin de Bacillus subtilis (Dragos & Kovacs, 2020) 13
Figura 8. Hidrólisis enzimática de la celulosa 14
Figura 9. Efecto del SO_2 y el tiempo de maceración en la dureza del grano de maíz 21
Figura 10. Efecto de la proteasa de Bacillus subtilis en la dureza del grano de maíz durante la maceración 23
Figura 11. Efecto de la celulasa en la dureza del grano de maíz durante la maceración . 25
Figura 12. Acción de la celulasa sobre el enlace enlaces β-1,4-glucosídicos en la celulosa 26
Figura 13. Efecto de la hemicelulasa en la dureza del grano de maíz durante la maceración 28
Figura 14. Estructura de fibra de maíz después de los diferentes tratamientos 31
Figura 15. Parámetros óptimos de maceración de maíz según modelo de superficie de respuesta 32

Índice de Tablas

Tabla 1. Condiciones experimentales de maceración de maíz en laboratorio según tipo y concentración de enzima, niveles de SO_2 y tiempo de reacción 16
Tabla 2. Rampas de temperatura del amilograma 18
Tabla 3. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar Efecto del SO_2 en la dureza del grano de maíz 20
Tabla 4. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la proteasa sobre la dureza del grano de maíz 23
Tabla 5. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la celulasa sobre la dureza del grano de maíz 25
Tabla 6. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la hemicelulasa sobre la dureza del grano de maíz 27
Tabla 7. Comparación de Tukey para concentración de almidón retenido en fibra de maíz macerado con dos combinaciones de tratamientos enzimáticos, tiempo de maceración de 17 horas y 1800ppm de SO_2 frente muestra patrón 32
Tabla 8. Perfil amilográfico de almidón con tratamiento enzimático y muestra patrón 33
Tabla 9. Comparación de Tukey para concentración de proteína retenida en la fibra en tratamientos con enzima y tiempo de maceración de 17 horas y muestra patrón 34
Tabla 10. Comparación de Tukey para concentración de proteína en agua de maceración en tratamientos con enzima, tiempo de maceración de 17 horas y muestra patrón 34

1. Resumen

La molienda húmeda de maíz es un proceso ampliamente utilizado para la separación de almidón, proteína, germen y fibra. Sin embargo, la etapa de maceración requiere hasta 48 horas y altas concentraciones de dióxido de azufre (SO_2), representando un desafío ambiental y energético significativo. Ante esta problemática, se propone el uso de enzimas comerciales (celulasa, hemicelulasa y proteasa) como estrategia biotecnológica para mejorar el proceso de maceración, buscando reducir el tiempo de proceso y la concentración de SO_2. El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de las enzimas mencionadas anteriormente en la reducción del tiempo de maceración y la concentración de dióxido de azufre (SO_2) en el proceso de molienda húmeda de maíz. para ello realizaron ensayos a escala de laboratorio, aplicando un diseño experimental de superficie de respuesta, variando concentraciones enzimáticas, niveles de SO_2 y tiempos de tratamiento. Además, se analizaron parámetros como dureza del grano, almidón y proteína retenidos en la fibra de maíz y calidad funcional del almidón. Los resultados demostraron que una combinación de 0,06 kg de celulasa y hemicelulasa por tonelada de maíz permitió reducir el tiempo de maceración en un 53% y la concentración de SO_2 en un 10%, sin afectar la calidad del almidón ni la recuperación proteica. En contraste, el uso de proteasa incrementó la solubilidad de la proteína, lo que podría limitar su recuperación durante etapas posteriores en el industrial por lo que se concluye que el tratamiento enzimático representa una alternativa viable, eficiente y sostenible frente al proceso convencional de maceración en la molienda húmeda de maíz.

Palabras Claves

Maíz, Maceración, Remojo, Molienda enzimática, Celulasas, Hemicelulasas, Proteasas

2. Abstract

Wet milling of corn is a widely used process for the separation of starch, protein, germ, and fiber. However, the steeping stage, which requires up to 48 hours and high concentrations of sulfur dioxide (SO_2), poses a significant environmental and energy challenge. To address this issue, the use of commercial enzymes (cellulase, hemicellulase, and protease) is proposed as a biotechnological strategy to improve the steeping process, aiming to reduce both processing time and SO_2 concentration. The objective of this research was to evaluate the application of the aforementioned enzymes in reducing steeping time and sulfur dioxide (SO_2) concentration during the corn wet milling process. Laboratory-scale trials were conducted using a response surface experimental design, varying enzyme concentrations, SO_2 levels, and treatment times. Additionally, parameters such as kernel hardness, starch and protein retained in corn fiber, and starch functional quality were analyzed. Results showed that a combination of 0.06 kg of cellulase and hemicellulase per metric ton of corn reduced steeping time by 53% and SO_2 concentration by 10%, without compromising starch quality or protein recovery. In contrast, the use of protease increased protein solubility, which could limit its recovery during subsequent industrial stages. Therefore, it is concluded that enzymatic treatment represents a viable, efficient, and sustainable alternative to the conventional steeping process in corn wet milling.

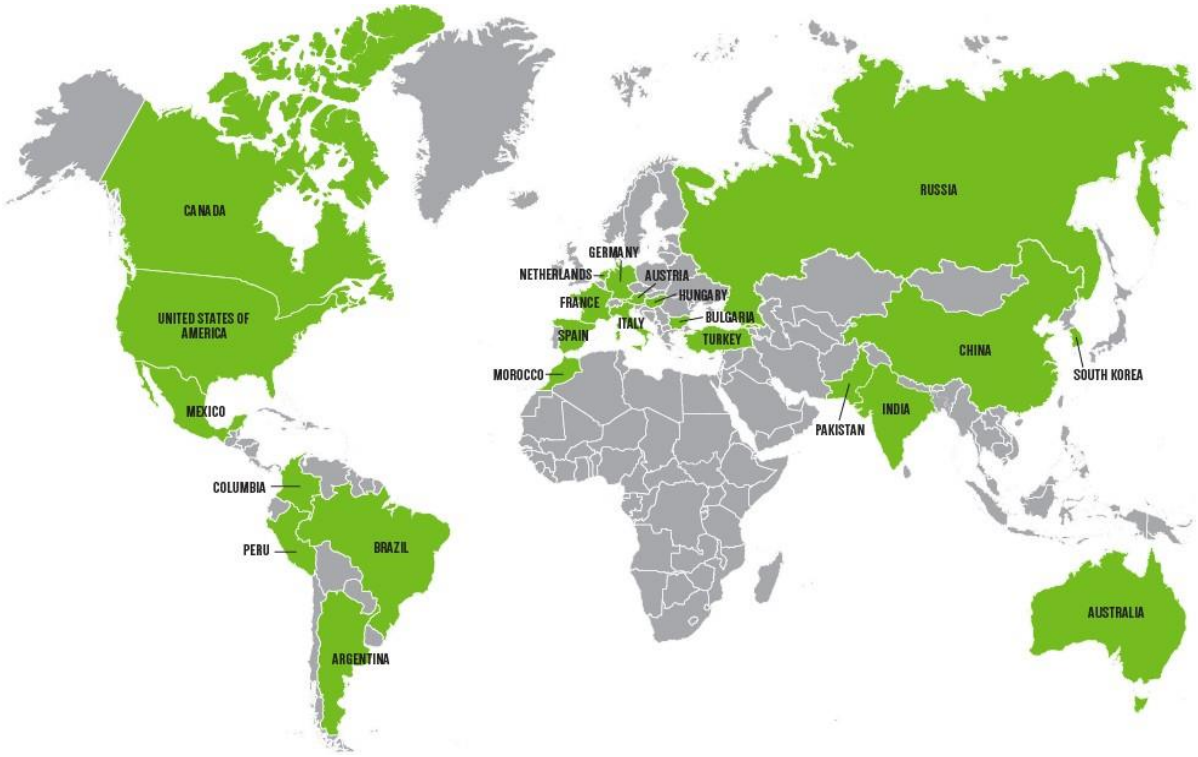
Keywords:

Maize, Steeping, Soaking, Enzymatic Milling, Cellulases, Hemicellulases, Proteases

3. Planteamiento del problema y justificación

Los cereales desempeñan un papel importante en la nutrición humana, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el 2023, se produjo en el mundo 2.789 millones de toneladas, siendo el maíz el cereal más producido con 1.193 millones de toneladas al año (Williams & Hubbs, 2024). En cuanto a su uso, el 56% está destinado para alimentación animal, el 31% para usos industriales y el 13% para consumo directo (Erenstein et al., 2022). Respecto a los procesos industriales del maíz, uno de estos es la molienda húmeda, la cual consiste en un conjunto de operaciones dentro de las que se encuentra la maceración o remojo del grano, la molienda y la separación. Dichas etapas se llevan a cabo con el objetivo de separar principalmente cuatro componentes del grano de maíz; almidón, proteína, germen y fibra (Rausch et al., 2019). Según la Asociación de Refinadores de Maíz o por sus siglas en ingles CRA, en Estados Unidos se muelen 33 millones de toneladas usando el método anteriormente descrito, dicha cantidad representa el 10% de la producción de maíz en este país (Corn Refiners Association, 2023). En países como India y Malasia se procesan anualmente 4,3 y 1,2 millones de toneladas de maíz usando la molienda húmeda, mientras en Colombia esta cifra es aproximadamente 430.000 toneladas al año (Deepak & Jayadeep, 2022; Meylinah, 2022). Cabe resaltar que existen plantas de molienda húmeda de en 23 países (Figura 1).

Figura 1. Ubicación de las plantas de molienda húmeda de maíz de los miembros del CRA (Corn Refiners Association (CRA), 2023.-a)



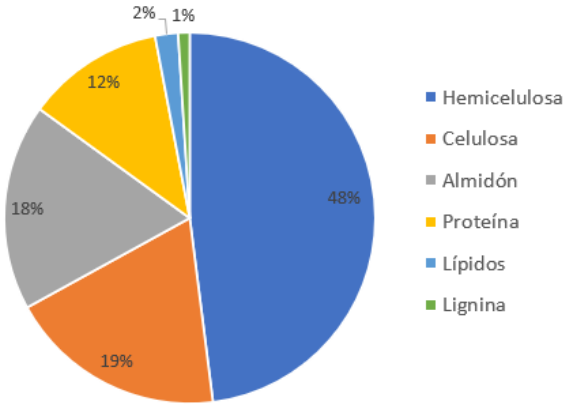
Una de las etapas más sensible de la molienda húmeda es la maceración o remojo, ya que de esta depende la eficiencia de la separación y recuperación del almidón y proteína, esta etapa consiste en el remojo del grano a temperaturas controladas entre 48 °C y 52 °C, durante un periodo de aproximadamente de 36 a 40 horas. Como consecuencia, de lo anterior y a los grandes volúmenes de maíz, la energía usada en el proceso de maceración representa aproximadamente el 21% de la energía total usada en toda la molienda húmeda según Singh & Johnston (2002), siendo este principalmente suministrado por fuentes no renovables para la generación de vapor requerido en el mantener las condiciones térmicas del sistema. Esta dependencia energética plantea desafíos significativos en términos de sostenibilidad, eficiencia operativa y costos.

Además del gasto energético, en esta fase se suele adicionar altas cantidades de dióxido de azufre (SO_2) con el fin de optimizar la separación de los componentes del grano de maíz y mejorar la recuperación de almidón (Ozturk et al., 2021a). El alto requerimiento de SO_2 en esta etapa incrementa el riesgo de emisiones a la atmósfera, conllevando implicaciones ambientales y sanitarias relevantes. Diversos estudios epidemiológicos han evidenciado que la exposición tanto a corto como a largo plazo al SO_2 está asociada con un aumento en la incidencia de enfermedades respiratorias, así como con un mayor riesgo de mortalidad por causas respiratorias (Orellano, Reynoso & Quaranta, 2021). También, el SO_2 en presencia de otros gases contaminantes de la atmósfera, puede provocar la formación de lluvia ácida, afectando negativamente ecosistemas naturales, así como daños en estructurales en las mismas plantas operacionales (Ramírez et al., 2009).

Debido las problemáticas mencionadas anteriormente, existe una creciente demanda de las agencias ambientales y empresas privadas para desarrollar alternativas a los procesos de molienda húmeda convencionales con el fin de reducir los impactos negativos que este proceso genera (Singh & Johnston, 2002). Autores como Li et al. (2023) y Ozturk et al. (2021b) han planteado el uso de enzimas tales como proteasas, celulosas, hemicelulosas, entre otras, con el fin de reducir los tiempos de remojo y la concentración de SO_2, así como aumentar la recuperación de almidón y proteína.

Los estudios anteriormente mencionados, se basan en diferentes enzimas comerciales, especializadas en la fragmentación de las paredes celulares del grano de maíz a través de la hidrólisis del xilano, principal componente de la hemicelulosa y de la celulosa la cual es una estructura lineal de β-Glucosa, estos polímeros son los principales componentes de la fibra no soluble de maíz (Figura 2) (Bazán-Colque et al., 2023). Así mismo como el uso de proteasas comerciales, ya que las estructuras relacionadas con las proteínas también están consideradas como contribuyentes a la retención de almidón, debido a que el endospermo vítreo periférico retiene los gránulos de almidón dentro de la fracción de fibra. La eliminación de la matriz proteica alrededor de los gránulos de almidón mediante el uso de estas enzimas ayuda a la liberación efectiva de los gránulos de almidón residuales de la fracción de fibra (Ozturk et al., 2021b).

Figura 2. Composición de la fibra de maíz



Nota. Elaborado a partir de la información suministrada por Bazán-Colque et al. (2023).

Este trabajo propone el uso de enzimas comerciales tipo hemicelulasa, celulasa y proteasa como estrategia biotecnológica para reducir significativamente los tiempos de remojo y la concentración de dióxido de azufre (SO_2), lo que permitiría disminuir el consumo energético asociado a esta fase, así como mitigar el riesgo de emisiones contaminantes a la atmósfera. Para ello se usarán enzimas suministradas por empresas líderes en el sector biotecnológico, como AB Enzymes, Novozymes e IFF, las cuales ofertan este tipo de enzimas a un costo que oscila entre 5 y 15 dólares por kilogramo, dependiendo del proveedor y la formulación específica. Además, de acuerdo con el modelo técnico propuesto por Ramírez et al. (2009), la implementación de enzimas en la molienda húmeda no solo mejora la eficiencia del proceso, sino que también reduce los costos de producción con relación al método convencional. teniendo en cuenta anterior, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo influye la aplicación de enzimas comerciales (celulasa, hemicelulasa y proteasa) en la reducción del tiempo de maceración y la concentración de dióxido de azufre (SO_2) en la molienda húmeda de maíz?

4. Marco Teórico

A continuación, se exponen las descripciones de los conceptos más importantes que abarca esta propuesta, con el fin de profundizar su contenido técnico y teórico.

4.1. Composición de maíz (*Zea Mays* L.)

El maíz (*Zea Mays* L.) es un cereal de gran relevancia para la nutrición humana y animal. El grano de maíz está conformado por: pericarpio el cual es una delgada cubierta que encierran el núcleo, este representa 5,3% del grano. Endospermo es la sección más grande del grano (aproximadamente 82%) y está conformado principalmente de almidón y proteína, siendo el almidón el de mayor proporción. El germen (embrión) es el 11,5% del grano, en este se almacena una alta proporción de aceite (Figura 3) (Mejía, 2003).

Figura 3. Estructura del grano de maíz

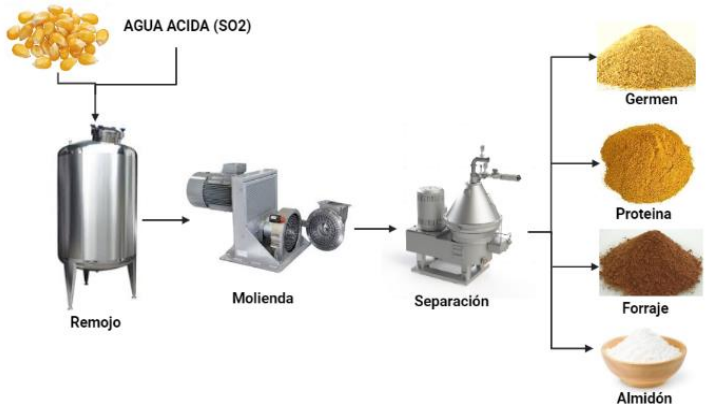


Nota. Elaborado a partir de Mejia (2003).

4.2. Molienda húmeda de maíz

La molienda húmeda es un conjunto de operaciones diseñadas para la separación y extracción de los componentes estructurales del grano de maíz, tales como germen, proteína, almidón y fibra, mediante el uso de medios acuosos (Ozturk et al., 2021a). Este procedimiento inicia con una etapa de remojo, en la cual los granos son ablandados por inmersión en agua o en una solución diluida de dióxido de azufre (SO_2), bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo. Una vez que el grano ha sido adecuadamente hidratado, se procede a la ruptura del pericarpio y a la separación del germen, la fibra, la proteína y el almidón. Finalmente, para mejorar la recuperación de almidón y proteína, la fibra es sometida a un proceso de lavado (Rausch & Eckhoff, 2016).

Figura 4. Proceso de molienda húmeda de maíz



Nota. Elaborado a partir de la información suministrada por Rausch & Eckhoff (2016).

4.3. Características generales de las enzimas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que actúan como catalizadores altamente específicos en los sistemas biológicos. Se clasifican funcionalmente en seis grupos: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas, según el tipo de reacción que catalizan (Khan, 2018). Su principal función es aumentar la velocidad de las reacciones químicas sin consumirse en el proceso, permitiendo que transformaciones que serían lentas o termodinámicamente desfavorables ocurran en escalas de tiempo compatibles con la vida celular. Esta aceleración se logra mediante la disminución de la energía de activación, facilitando la formación del complejo enzima-sustrato y promoviendo su conversión eficiente en productos, hasta alcanzar el equilibrio dinámico del sistema (Cremonesi, 2002).

Para ejercer su función catalítica, muchas enzimas requieren la presencia de cofactores, los cuales pueden ser iones metálicos como calcio (Ca^{2+}), zinc (Zn^{2+}) o magnesio (Mg^{2+}), que estabilizan la estructura tridimensional de la enzima o participan directamente en la catálisis. También existen coenzimas, que son moléculas orgánicas derivadas de vitaminas, como NAD^{+}, FAD y coenzima A, que actúan como transportadores de electrones o grupos químicos (Cremonesi, 2002). Además de los cofactores, la actividad enzimática puede ser modulada por inhibidores, los cuales se clasifican en reversibles e irreversibles. Los inhibidores reversibles incluyen los competitivos, que compiten con el sustrato por el sitio activo; los no competitivos, que se unen a sitios distintos del activo alterando la función sin impedir la unión del sustrato; y los acompetitivos, que se unen exclusivamente al complejo enzima-sustrato. En contraste, los inhibidores irreversibles se enlazan covalentemente a la enzima, inactivándola de forma permanente (Nelson & Cox, 2008).

Además de los cofactores, coenzimas e inhibidores, la actividad enzimática está condicionada por factores como el pH y la temperatura, los cuales influyen en la estructura tridimensional de la enzima y en la ionización de los grupos funcionales del sitio activo. El pH determina el estado de protonación de los aminoácidos involucrados en la catálisis, afectando la formación del complejo enzima-sustrato y la eficiencia

catalítica. Cada enzima presenta un rango óptimo de pH en el que alcanza su máxima velocidad de reacción, expresada como kcat (constante catalítica), mientras que valores extremos pueden ocasionar la desnaturalización parcial o total de la enzima, reduciendo drásticamente su actividad (Nelson & Cox, 2008). De manera similar, la temperatura modula la energía cinética y la flexibilidad conformacional de la enzima: incrementos moderados favorecen la velocidad de reacción hasta alcanzar una temperatura óptima, pero valores superiores provocan pérdida irreversible de estructura terciaria y cuaternaria, disminuyendo la actividad catalítica (Cremonesi, 2002).

Desde una perspectiva cinética, la velocidad de reacción enzimática depende tanto de la concentración de sustrato como de las propiedades intrínsecas de la enzima. Estas últimas propiedades incluyen la actividad catalítica, la especificidad por el sustrato, la afinidad enzimática, así como sus condiciones óptimas de pH y temperatura, que están determinadas por su estructura tridimensional y estabilidad conformacional. Además de factores como la presencia de cofactores y la resistencia a la desnaturalización (Cremonesi, 2002). El comportamiento de estas reacciones se describe mediante el modelo de Michaelis-Menten, que establece la siguiente ecuación:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Nota: $\mathbf{V_0}$: Velocidad inicial de la reacción; $\mathbf{V_{max}}$**:** Velocidad máxima alcanzada cuando la enzima está saturada; **[S]:** Concentración de sustrato; $\mathbf{K_m}$**:** Constante de Michaelis, la cual indica la afinidad de la enzima por el sustrato (Nelson & Cox, 2008).

El modelo cinético de Michaelis-Menten es esencial para comprender la dinámica de las enzimas no alostéricas, las cuales constituyen la mayoría de las empleadas en procesos industriales. Este modelo describe cómo la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato y permite derivar parámetros cinéticos fundamentales: Km, Vmax y kcat. Estos parámetros son la base para comparar la eficiencia catalítica entre diferentes enzimas y evaluar su comportamiento bajo condiciones específicas. Vmax representa la velocidad máxima alcanzada cuando todos los centros activos están saturados; es una propiedad extensiva, dependiente de la cantidad de enzima presente. En contraste, kcat (constante catalítica) es una propiedad intrínseca que indica el número de moléculas de sustrato transformadas por cada centro activo por unidad de tiempo en condiciones de saturación. Este parámetro es crítico en aplicaciones industriales, ya que refleja la capacidad real de la enzima para catalizar reacciones bajo condiciones óptimas. En el contexto de este proyecto, kcat permite evaluar la influencia de factores como pH y temperatura, que afectan la conformación estructural y la estabilidad de la enzima, determinando su eficiencia catalítica. Por ello, el modelo de Michaelis-Menten no solo predice el comportamiento enzimático, sino que también orienta la selección y optimización de enzimas para maximizar la productividad y sostenibilidad del proceso (Nelson & Cox, 2008).

4.4. Características de algunas de las enzimas propuestas para la reducción de tiempos y SO_2 en la maceración de maíz

A continuación, se describen las principales características de algunas enzimas usadas en la reducción de tiempos de maceración y concentración de SO_2 en la molienda húmeda de maíz.

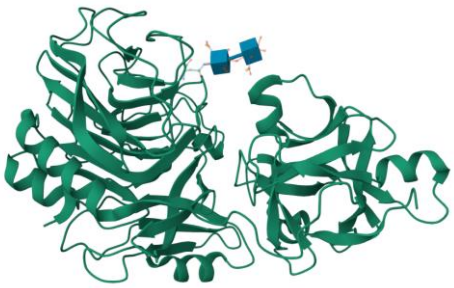
Una de las celulasas comerciales se obtiene a partir del *Trichoderma reesei* (Figura 5), dicha enzima es secretada a través de las paredes celulares lo que permite una mayor facilidad en la producción industrial. En cuanto a su estructura es una proteína de 418 aminoácidos que un dominio catalítico con residuos activos bien caracterizados, un donador/aceptor de protones en la posición Glu 239 y un nucleófilo en la posición Glu 350. Esta hidroliza enlaces β-1,4-glucosídicos en polisacáridos como la celulosa, actuando sobre regiones internas de la cadena. Esta enzima muestra actividad hidrolítica entre pH 3,5 a 6,0 y resistente a temperaturas menores a 65°C (UniProt, 2025a).

Figura 5. Estructura cristalina de celulasa Cel5A de Trichoderma reesei (Lee et al. 2011)



Otra de las enzimas usada es la hemicelulosa Alpha-L-arabinofuranosidasa (Figura 6) esta destaca por su capacidad de degradar arabinoxilanos, un tipo de hemicelulosa presente en las paredes celulares de plantas y cereales. Esta enzima es secretada por el *Aspergillus kawachii* y está compuesta por 499 aminoácidos y presenta un dominio catalítico con sitios activos bien definidos, el nucleófilo es ácido glutámico (Glu221) mientras el donador de protones es la asparagina (Asp297), rodeados por múltiples sitios de unión al sustrato. Esta arquitectura enzimática permite una alta especificidad y eficiencia catalítica. Dicha enzima muestra una actividad óptima a pH 4,0 y una temperatura ideal de 55 °C, siendo estable entre pH 3,5 y 7,0 (UniProt, 2025b).

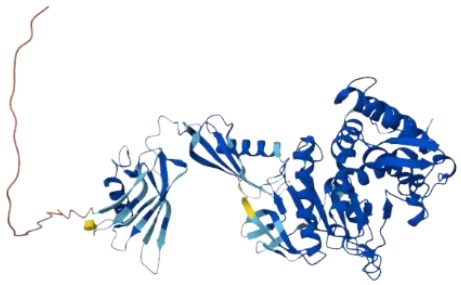
Figura 6. Estructura cristalina de la hemicelulasa Alpha-L-arabinofuranosidasa (Miyanaga 2004)



Adicionalmente, se ha identificado que las proteínas de la estructura del grano de maíz encapsulan el almidón contribuyendo con la retención de este dentro de una fracción de fibra. En consecuencia, se ha planteado el uso de proteasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas, lo que permitiría aún mayor recuperación de almidón (García-González et al., 2019).

Una de las proteasas usadas es la denominada Bacillolysin se secretada por el *Bacillus subtilis* (Figura 7), la cual está compuesta por 538 aminoácidos y presenta un dominio catalítico de ácido glutámico (Glu370) como nucleófilo y una histidina (His453) que actúa como donador de protones.

Figura 7. Estructura modelada mediante AlphaFold de la proteasa *bacillolysin de Bacillus subtilis* (Dragos & Kovacs, 2020)



La proteasa Bacillolysin de Bacillus subtilis muestra actividad hidrolítica entre pH 5,5 a 9,0 y es estable a temperaturas menores a 60°C, aunque aún no se cuenta con estudios de cristalografía su estructura fue modelada con ayuda de AlphaFold (Figura 8) (Unipro 2025c).

4.5. Alternativas investigadas para la reducción de SO_2 y tiempos en la maceración de maíz

Con el objetivo de reducir el uso de SO_2 y el tiempo en el proceso de maceración, se han explorado diversas alternativas. Una de ellas es la adición de ácido láctico durante el remojo, ya que este compuesto facilita la descomposición de la matriz proteica del endospermo, lo que mejora el rendimiento de almidón. Se ha reportado un incremento de entre 3% y 12% en el rendimiento de almidón al adicionar 0.55% de ácido láctico junto con SO_2, evidenciando un efecto sinérgico entre ambos (Dailey et al., 2002).

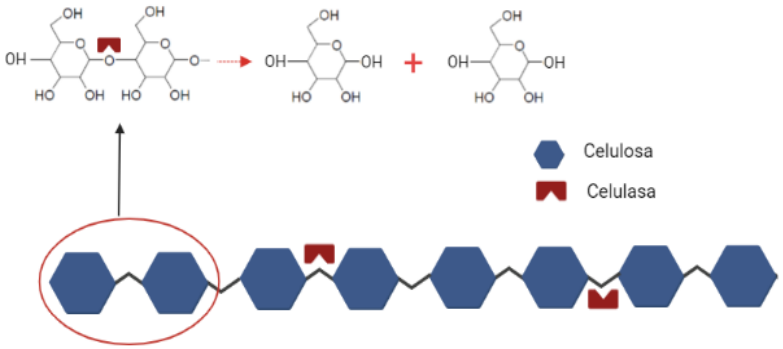
Otra alternativa biotecnológica es el uso de consorcios microbianos termófilos y acidófilos como sustitutos ecológicos del SO_2 en el remojo contracorriente. Estos consorcios son desarrollados mediante ingeniería adaptativa, permitiendo su tolerancia a las condiciones de pH y temperatura propias del proceso. Su implementación ha demostrado ser eficaz en la reducción del uso de SO_2, manteniendo buenos rendimientos de almidón (Sun et al., 2024).

Singh et al. (2010) analizaron reducción de tiempos de remojo y en la concentración de SO_2 mediante el uso de proteasas, en este estudio se planteó la adición de la enzima después de la molienda, ajustando el pH y garantizando un tiempo de incubación entre

la enzima y el maíz molido. Esta investigación demostró que la implementación de esta enzima disminuyó los tiempos de remojo de 48 horas a 16 horas y la concentración de SO_2 de 1500 ppm a 600 ppm. No obstante, la implementación del procedimiento planteado es costoso y requiere alta cantidad de químicos, esto debido a la adecuación de un reactor para grandes volúmenes y a los químicos requeridos para el ajuste de pH.

Debido a que la fibra del maíz está constituida principalmente por celulosa y hemicelulosa (Bazán-Colque et al., 2023), los cuales son polisacáridos constituidos por cadenas de D-glucosa, unidas por enlaces glucosídicos β 1-4 (Figura 8). Por su parte, las hemicelulosas también cuentan con enlaces glucosídicos β 1-6 en las que se presentan otros azúcares y ácidos glucurónicos (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

Figura 8. Hidrólisis enzimática de la celulosa



Nota. Elaborado a partir de la información suministrada por Bazán-Colque et al. (2023).

Debido a lo anterior, autores como Ozturk et al. (2021b) evaluaron el uso de proteasas, celulosas, hemicelulosas, así como a la combinación de estas, con el objetivo de mejorar la obtención de almidón a partir del lavado de la fibra obtenida después de la separación primaria del almidón y proteína. En esta investigación se evidenció que la combinación de las enzimas mencionadas anteriormente, proporcionaron la mayor liberación de almidón y proteína de la fibra de maíz. Sin embargo, en este estudio no se tuvo en cuenta los tiempos de remojo del maíz ni concentración de SO_2 en esta etapa.

5. Hipótesis o supuesto

La incorporación de las enzimas celulasa, hemicelulasa y proteasa, ya sea de forma individual o en combinación, durante la etapa de maceración en el proceso de molienda húmeda del maíz, permite disminuir el tiempo de proceso y reducir el uso de dióxido de azufre SO_2.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de enzimas comerciales (celulasa, hemicelulasa y proteasa), aplicadas de manera individual y combinadas, sobre la reducción del tiempo de maceración y la concentración de dióxido de azufre (SO_2) durante el proceso de molienda húmeda de maíz.

6.2. Objetivos específicos

6.2.1. Establecer las mejores condiciones de concentraciones de enzimas, de tiempo de maceración, concentración de SO_2 para la maceración enzimática de granos de maíz usando enzimas comerciales de tipo celulasas, hemicelulasas y proteasas.

6.2.2. Determinar las concentraciones de almidón y proteína retenida en la fibra de maíz aplicando las mejores condiciones para el uso combinado de las enzimas evaluadas.

6.2.3. Caracterizar la calidad funcional del almidón y la solubilidad de la proteína obtenidos a partir del maíz tratado con las mejores condiciones obtenidas para el uso combinado de las enzimas comerciales tipo celulasa, hemicelulasa y proteasa.

7. Metodología

Para el desarrollo de los objetivos planteados en este estudio, se llevó a cabo una investigación de tipo experimental en las instalaciones de una empresa ubicada en la ciudad de Cali, Colombia. Esta compañía cuenta con una planta de molienda húmeda de maíz con una capacidad instalada de 1.200 toneladas de maíz molido por día, y una proyección de expansión a 1.500 toneladas diarias en los próximos tres años. Los ensayos experimentales se realizaron a escala de laboratorio, replicando las condiciones operativas reales de la planta industrial.

7.1. Efecto de las enzimas en la dureza del maíz

Los ensayos se realizaron a nivel de laboratorio utilizando corridas de 2 kg de maíz dentado *(Zea mays* cv. indentata) importado de Estados Unidos. A cada corrida se le adicionaron 2 litros de agua con concentraciones de dióxido de azufre (SO_2) de 0, 100 y 2000 ppm.

Para cada concentración de SO_2, se evaluaron tres niveles de adición de enzimas comerciales:

- Celulasa 0; 0,03 y 0,1 g por kg de maíz; equivalentes a 0; 450 y 1500 ECU (Unidades de actividad celulasas) por kg de maíz respectivamente.
- Hemicelulasa: 0; 0,03 y 0,1 g por kg de maíz; equivalentes a 0; 15,9 y 53 ARMU (Unidades de actividad hemicelulasa) por kg de maíz respectivamente.
- Proteasa: 0; 0,1 y 0,4 g por tonelada de maíz. equivalentes a 0; 84 y 336 UHB (Unidades de actividad proteolítica) por kg de maíz respectivamente.

Nota: Para efectos de este estudio, las concentraciones enzimáticas se expresarán en gramos de enzima por kilogramo de maíz.

La dureza del grano se evaluó a las 8, 12, 24 y 32 horas después de iniciada la reacción enzimática (Tabla 1).

Tabla 1. Condiciones experimentales de maceración de maíz en laboratorio según tipo y concentración de enzima, niveles de SO_2 y tiempo de reacción

Tipo de Enz	Concentración, g enz/Ton de maíz	SO_2, ppm	Tiempo, h
	0	0	8
Hemicelulasa	0,03	1000	12
	0,1	2000	24
			32
	0	0	8
Celulasa	0,03	1000	12
	0,1	2000	24
			32
	0	0	8
Proteasa	0,1	1000	12
	0,4	2000	24
			32

Finalmente, las muestras se introdujeron en baño de maría a 52°C, simulando las condiciones de temperatura del proceso de maceración real. Cumplido los tiempos mencionados en la Tabla 1 se tomaron muestras de maíz la las cuales para garantizar la neutralización de las enzimas se bajó el pH a 3,0 con ácido clorhídrico al 4% (v/v) para finalmente analizar la dureza del grano bajo la metodología explicada en el numeral 7.2.

7.2. Dureza de granos de maíz

Para cada tiempo de reacción evaluado, se tomaron 10 muestras individuales de granos de maíz. La dureza fue determinada usando un analizador de textura marca Stable Micro System, referencia TA. XT, equipado con una sonda cilíndrica de 5 mm de diámetro (P/5) y una celda de carga con capacidad máxima de 30 kg fuerza. Este método consistió en aplicar una compresión uniaxial en sentido vertical hasta alcanzar una de deformación del 40% respecto a la altura original del grano. La dureza se definió como la fuerza máxima registrada por el equipo justo antes de la ruptura del grano, expresada en kilogramos-fuerza (kgf).

7.3. Preparación de la fibra

Una vez finalizado el tiempo de reacción enzimática establecido, se tomó una muestra de 500 g de maíz para realizar una molienda gruesa utilizando un molino de discos manual. Posteriormente, 200 g del material molido fueron suspendidos en 500 mL de una solución salina al 13 % (p/p), bajo agitación constante a 300 rpm usando un agitador Marca IKA modelo RW20 digital durante 1 hora, con el objetivo de facilitar la separación del germen. Tras la remoción del germen, se tomaron 100 g de maíz desprovisto de germen para someterlos a una segunda molienda fina con el mismo equipo. El producto obtenido fue sometido a cuatro lavados consecutivos con 500 mL de agua destilada cada uno, bajo agitación constante usando el agitador anteriormente mencionado, con el fin de remover el almidón y la proteína residual adherida a la fibra. Este procedimiento emula lo realizado en una planta convencional de molienda húmeda. Finalmente, la fibra lavada fue recolectada para la realización de los análisis correspondientes.

7.4. Microscopía de la fibra

Se examinó las diferentes muestras de fibra de maíz utilizando un microscopio óptico LEICA DM750, empleando un objetivo de 10X, con el fin de observar los efectos de la acción enzimática sobre la estructura de la fibra.

7.5. Proteína retenida en fibra

El análisis de proteína se realizó utilizando el método Dumas, reconocido por su precisión y rapidez en la determinación del contenido de nitrógeno total en muestras orgánicas. Para ello, se tomó una alícuota de 1 g de fibra lavada, obtenida tras el proceso de separación. La muestra fue procesada en un analizador de proteína DUMATHERM N Pro, el cual opera bajo el principio de combustión a alta temperatura en atmósfera de oxígeno. Durante este proceso, el nitrógeno presente en la muestra se convierte en óxidos de nitrógeno, que posteriormente son reducidos a N_2 molecular y cuantificados mediante detector térmico de conductividad.

El contenido de nitrógeno elemental obtenido se utilizó para calcular el porcentaje de proteína total, aplicando el factor de conversión estándar de 6,25 (Pupim, Martin & Ikizler, 2013).

7.6. Perfil amilográfico de almidón

La calidad funcional del almidón se evaluó mediante un viscoamilógrafo Brabender Viscograph-E, el cual permite caracterizar el comportamiento reológico del almidón durante los procesos de calentamiento y enfriamiento. Para ello, se preparó una dispersión de almidón al 8% en base seca, utilizando agua destilada como medio de suspensión. El análisis se realizó siguiendo las rampas de temperatura que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Rampas de temperatura del amilograma

Temperatura, °C	Tiempo, minutos
30	0
30 - 90	0 a 8
90	8 a 12,5
90 - 50	12,5 a 17,5
50	22,5

7.7. Almidón retenido en fibra

La concentración de almidón retenido en la fibra se determinó por polarimetría, siguiendo el método oficial establecido por la AOAC (1996) y la Fundación de Investigación de Industrias del Maíz, División de la Asociación de Refinadores de Maíz INC (1986). Para ello se pesó 2 g de fibra el cual se lavó con etanol al 10% (p/p) seguido se adicionó la fibra lavada junto con 10 mL de agua destilada y 60 mL de cloruro de calcio a 3,7M a un Erlenmeyer. Posteriormente, se llevó a un extractor soxhlet marca Sigma durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se adicionó la muestra en un balón de 100 mL con ácido fosfotúngstico al 1,25% a continuación se filtró con mediante un filtro de papel Whatman® 2. Finalmente, el filtrado se leyó en un polarímetro Rudolph a una longitud de 589 µm. El cálculo del almidón retenido en la fibra se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\text{almidon, \%bs} = \frac{\text{angulo de rotacion observado} * 100}{203 * 2\,\frac{\text{Peso de la muestra, g}}{100\text{ mL}} * \frac{\text{Sustancia seca, \%}}{100}}$$

Nota: %bs: Porcentaje en base seca; 203: representa la rotación específica del almidón de maíz

7.8. Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tipo y concentración de enzimas, el tiempo de reacción y la concentración de dióxido de azufre (SO_2) sobre la dureza del grano, se empleó un diseño multifactorial para cada tipo de enzima estudiada, considerando los rangos experimentales definidos en la Tabla 1. Donde Las concentraciones mínima y máxima de

las enzimas utilizadas fueron establecidas con base en las recomendaciones técnicas de los fabricantes de en las enzimas comerciales empleadas. En cuanto a la concentración de SO_2, se tomó como referencia el valor máximo utilizado en condiciones industriales reales de maceración de maíz, criterio que también se aplicó para definir el tiempo máximo de cocción en las distintas corridas experimentales (Kuehl, 2000).

Los resultados obtenidos de los diferentes ensayos de laboratorio se analizaron usando el diseño de superficie de respuesta completo, este enfoque estadístico permitió modelar las interacciones entre variables y determinar su influencia sobre la respuesta objetivo. Para la optimización multivariable del proceso, se aplicó la función de deseabilidad de Derringer, la cual transformó cada respuesta en una escala de deseabilidad entre 0 (mínimamente deseable) y 1 (máximamente deseable). Esta herramienta facilitó la identificación de las condiciones experimentales que periten la reducción del tiempo de proceso y la concentración de SO_2, minimizando el uso de enzimas manteniendo la retención máxima de almidón y proteína similares a las condiciones al proceso convencional (Kuehl, 2000).

Una vez determinadas dichas condiciones, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de confianza del 95 % bilateral, con el objetivo de comparar los contenidos de almidón y proteína retenidos en la fibra de maíz entre los distintos tratamientos y muestras patrón las cuales fueron tomadas directamente de una planta de molienda húmeda convencional.

Los análisis anteriormente mencionados se realizaron mediante el software estadístico Minitab versión 22 (2023).

8. Resultados y discusión

8.1. Efecto de la concentración de SO_2 en la dureza del maíz

El análisis de varianza (ANOVA) presentado en la Tabla 3, mostró que el modelo fue altamente significativo (F = 91,65; p < 0,001) (Fila 1), explicando la variabilidad en la dureza del grano de maíz. Entre los factores evaluados, la concentración de dióxido de azufre (SO_2) presentó el mayor efecto (F = 253,75; p < 0,001) (Fila 4), seguida por el tiempo de maceración (F = 147,32; p < 0,001) (Fila 3), confirmando su influencia determinante en la respuesta. Se detectó un efecto cuadrático significativo para SO_2 (F = 35,54; p < 0,001) (Fila 7), indicando una relación no lineal, mientras que el término cuadrático del tiempo no fue relevante (F = 0,10; p = 0,755) (Fila 6). Asimismo, la interacción tiempo–SO_2 resultó significativa (F = 8,42; p = 0,006) (Fila 9), lo que sugiere dependencia entre factores y la necesidad de considerar su combinación para optimización. El error puro es relativamente bajo (MC = 0,1213) (Fila 12), lo que indica que el sistema es estable y que las diferencias observadas entre tratamientos no se deben al azar, sino a los factores estudiados (tiempo y SO_2) (Kuehl, 2000).

Tabla 3. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar Efecto del SO_2 en la dureza del grano de maíz

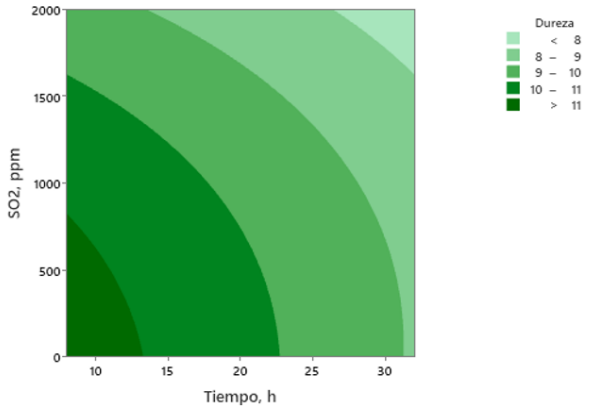
	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
1	Modelo	5	86,5784	17,3157	91,65	0,000
2	Lineal	2	75,7719	37,8860	200,53	0,000
3	Tiempo, h	1	27,8318	27,8318	147,32	0,000
4	SO_2, ppm	1	47,9401	47,9401	253,75	0,000
5	Cuadrado	2	6,7337	3,3668	17,82	0,000
6	Tiempo, h*Tiempo, h	1	0,0186	0,0186	0,10	0,755
7	SO_2, ppm*SO_2, ppm	1	6,7151	6,7151	35,54	0,000
8	Interacción de 2 factores	1	1,5912	1,5912	8,42	0,006
9	Tiempo, h*SO_2, ppm	1	1,5912	1,5912	8,42	0,006
10	Error	42	7,9349	0,1889		
11	Falta de ajuste	6	3,5667	0,5944	2,80	0,000
12	Error puro	36	4,3683	0,1213		
13	Total	47	94,5133			

La interacción entre la concentración de dióxido de azufre (SO_2) y el tiempo de maceración sobre la dureza del grano de maíz, descrita en la Tabla 3, se visualiza en la Figura 9, que evidencia la tendencia del proceso y su comportamiento. Se observa que el maíz sometido a maceración sin adición de SO_2 mantiene valores de dureza entre 9 y 10 gramos-fuerza (gf) incluso después de 32 horas de tratamiento. En contraste, la aplicación de soluciones con 2000 ppm de SO_2 reduce la dureza a valores inferiores a 8 gf. Estos resultados validan la escala experimental utilizada, al ser consistentes con los obtenidos en muestras industriales, cuyo promedio de dureza es de 7,6 ± 0,5 gf, condición óptima para la separación de almidón, proteína y germen en la molienda húmeda (Rausch & Eckhoff, 2019).

Este comportamiento confirma que la disminución de dureza depende de la acción sinérgica de ambos factores: el tiempo prolongado favorece la difusión del agente químico

en la matriz del endospermo, mientras que el SO_2 actúa como agente reductor, rompiendo enlaces disulfuro en proteínas estructurales (Obadi et al., 2023). Como resultado, se produce la solubilización y dispersión de la matriz proteica que rodea los gránulos de almidón, lo que facilita su liberación. Este efecto se intensifica bajo condiciones de alta concentración de SO_2 (≈2000 ppm) y tiempos prolongados de maceración (≥32 horas), alcanzando durezas críticas para la eficiencia del proceso.

Figura 9. Efecto del SO_2 y el tiempo de maceración en la dureza del grano de maíz



Nota. Donde la dureza del grano de maíz está dada en gramos fuerza (gf). La Figura muestra la interacción entre la concentración de SO_2 (eje Y, en ppm) y el tiempo de maceración (eje X, en horas) y como estos afectan la dureza de los granos de maíz expresada en gramos fuerza (gf) la cual es representada mediante una escala cromática: colores oscuros indican mayor dureza, mientras que tonos claros corresponden a granos más blandos.

La Figura 9 evidencia la interacción entre tiempo de maceración y concentración de SO_2 sobre la dureza del grano de maíz, parámetro crítico para la eficiencia en la separación de almidón, proteína y germen en la molienda húmeda. Este comportamiento confirma que la reducción de dureza depende de la acción sinérgica de ambos factores: el tiempo prolongado permite la difusión del agente químico en la matriz del endospermo, mientras que el SO_2 actúa como agente reductor, rompiendo enlaces disulfuro en proteínas estructurales (Obadi et al., 2023).

La reducción en la dureza del grano está directamente asociada con una mayor recuperación de almidón durante la molienda húmeda, tal como lo reportaron Singh et al. (2023), quienes evidenciaron incrementos en la recuperación de almidón, proteína y germen en maíces con endospermo blando frente a aquellos más duros. Por esta razón, las plantas industriales han estandarizado soluciones de maceración con concentraciones de SO_2 entre 2000 y 2600 ppm, aplicadas durante 32 a 40 horas a temperaturas controladas de 50–52 °C, alcanzando durezas finales cercanas a 7,6 ± 0,5 gf, óptimas para la separación de fracciones (Rausch & Eckhoff, 2019). Sin embargo, estas condiciones implican un elevado consumo energético: aproximadamente el 21 % de la energía total del proceso, lo que equivale a cerca de 12.550 megavatios/año en una planta de 2500 ton/día (Ramírez et al., 2009), representando costos superiores a US$12,5 millones anuales solo en energía térmica. A esto se suma el uso intensivo de SO_2, que para esta misma capacidad alcanza 461.926 kg/año, con un costo estimado cercano a US$15.000 anuales y riesgos asociados a emisiones atmosféricas y formación de lluvia ácida (Singh & Johnston, 2002;

Ramírez et al., 2009). Estos factores plantean desafíos económicos y ambientales que impulsan la búsqueda de alternativas más sostenibles, como el uso de enzimas para reducir tiempos y concentraciones de SO_2.

8.2. Efecto de las enzimas sobre la dureza del maíz

A continuación, se presentan los resultados del efecto de las enzimas sobre la dureza del grano de maíz durante la etapa de maceración. Este análisis considera la influencia de diferentes tipos de enzimas (proteasa, celulasa y hemicelulasa), sus concentraciones, el tiempo de tratamiento y los niveles de dióxido de azufre (SO_2), con el objetivo de determinar su impacto en la reducción de la dureza y, por ende, en la eficiencia del proceso de molienda húmeda. Los resultados se discuten en función de la significancia estadística y la interacción entre factores, destacando las condiciones que permiten alcanzar valores óptimos para la separación de almidón, proteína.

8.2.1. Proteasa

El análisis de varianza de la Tabla 4 mostró que el modelo fue altamente significativo ($F = 89,56$; $p < 0,001$) (Fila 1), explicando la variabilidad en la dureza del grano de maíz. Entre los factores evaluados, el tiempo de maceración presentó el mayor efecto ($F = 380,17$; $p < 0,001$) (Fila 3), seguido por la concentración de dióxido de azufre (SO_2) ($F = 151,37$; $p < 0,001$) (Fila 4) y la dosis de proteasa ($F = 39,98$; $p < 0,001$) (Fila 5), confirmando su influencia determinante en la respuesta. Se detectaron efectos cuadráticos significativos para SO_2 ($F = 88,89$; $p < 0,001$) (Fila 8) y para la concentración de proteasa ($F = 45,70$; $p < 0,001$) (Fila 9), lo que indica una relación no lineal y la existencia de puntos óptimos para ambos factores. En contraste, el término cuadrático del tiempo no fue relevante ($F = 4,23$; $p = 0,052$) (Fila 7), sugiriendo que su efecto es predominantemente lineal. Respecto a las interacciones, la combinación SO_2–proteasa mostró el mayor impacto ($F = 36,06$; $p < 0,001$) (Fila 13), evidenciando una fuerte sinergia entre el agente químico y la enzima. La interacción tiempo–SO_2 también resultó significativa ($F = 12,91$; $p < 0,001$) (Fila 11), mientras que tiempo–proteasa presentó un efecto marginal ($F = 4,08$; $p = 0,050$) (Fila 12). Estos hallazgos confirman que la optimización del proceso requiere considerar la interacción entre variables, no solo sus efectos individuales. El error puro fue relativamente bajo (MC = 0,0946) (Fila 16), lo que indica que el sistema es estable y que las diferencias observadas entre tratamientos se deben a los factores estudiados (tiempo, SO_2 y proteasa), y no al azar. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Singh et al. (2010), quienes observaron efectos similares en la reducción de tiempos de maceración y uso de SO_2 (Kuehl, 2000).

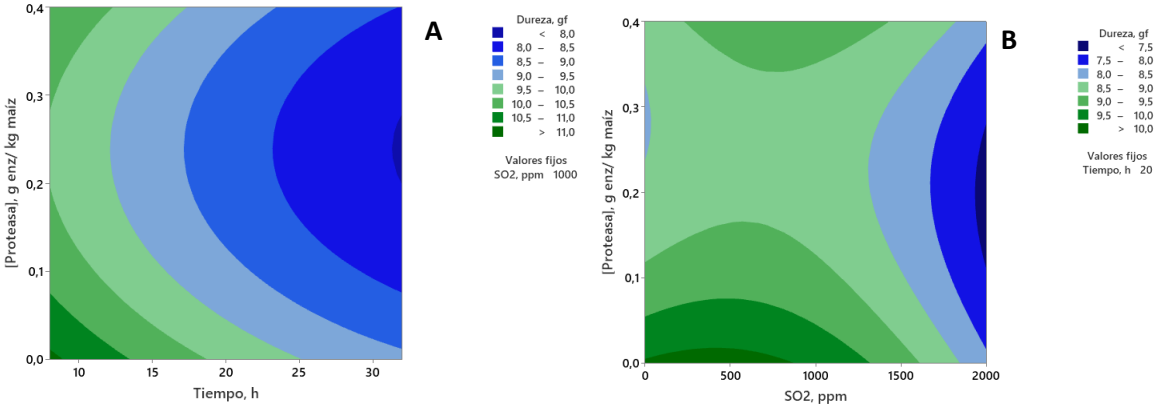
En este estudio, se observó que una dosis de 0,2 g proteasa /kg de maíz, combinada con 1800 ppm de SO_2 y 20 horas de tratamiento, permitió alcanzar valores de dureza cercanos a 7,8 gf, comparables con los obtenidos en procesos industriales convencionales (7,6 ± 0,5 gf) (Figura 10). La Figura 10A muestra la relación entre la concentración de enzima y el tiempo de maceración, en esta se observa que la reducción de dureza se intensifica a partir de las 20 horas, alcanzando valores cercanos a 8 gf cuando se emplean dosis de 0,2 g/kg. Este comportamiento indica que el tiempo es determinante para que la proteasa ejerza su efecto máximo. Por otro lado, la Figura 10B la interacción entre la concentración de proteasa y los niveles de SO_2, donde se aprecia que, con 0,2 g/kg de enzima y 1800 ppm de SO_2, la dureza se reduce hasta aproximadamente 7,8 gf. Al integrar ambos gráficos, se

puede apreciar que la mejor condición combina la dosis enzimática y la concentración de SO_2 mostradas en la Figura 10B con el tiempo crítico identificado en la Figura 10A. Esta sinergia explica por qué es posible disminuir la concentración de SO_2 sin comprometer la eficiencia del ablandamiento. Esto es debido a la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las de las proteínas estructurales causada por la acción de la proteasa, ayudando a la degradación de la matriz proteica que proporciona la dureza del grano de maíz además de retener el almidón incrustado en la fibra (Ozturk et al., 2021b).

Tabla 4. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la proteasa sobre la dureza del grano de maíz

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
1	Modelo	9	186,690	20,7433	89,56	0,000
2	Lineal	3	131,302	43,7672	188,97	0,000
3	Tiempo	1	88,049	88,0493	380,17	0,000
4	SO_2	1	35,058	35,0581	151,37	0,000
5	[Proteasa]	1	9,259	9,2590	39,98	0,000
6	Cuadrado	3	32,151	10,7171	46,27	0,000
7	Tiempo*Tiempo	1	0,980	0,9803	4,23	0,052
8	SO_2*SO_2	1	20,587	20,5868	88,89	0,000
9	[Proteasa]*[Proteasa]	1	10,584	10,5841	45,70	0,000
10	Interacción de 2 factores	3	11,361	3,7870	16,35	0,000
11	Tiempo*SO_2	1	2,991	2,9908	12,91	0,000
12	Tiempo*[Proteasa]	1	0,019	0,0186	4,08	0,050
13	SO_2*[Proteasa]	1	8,352	8,3516	36,06	0,000
14	Error	134	31,035	0,2316		
15	Falta de ajuste	26	20,813	0,8005	1,46	0,000
16	Error puro	108	10,222	0,0946		
17	Total	143	217,725			

Figura 10. Efecto de la proteasa de *Bacillus subtilis* en la dureza del grano de maíz durante la maceración



Nota. Donde **A)** Interacción entre la concentración de la dosis de proteasa (eje Y, g de enzima / kg de maíz) y el tiempo de maceración (eje X, en horas) con concentración constante de SO_2 a 1000 ppm; **B)** Interacción entre la concentración de la dosis de proteasa (eje Y, g de enzima / kg de maíz) la concentración de SO_2 (eje X, en ppm) a 20 horas de tratamiento. La dureza de los granos de maíz (expresada en gf) la cual es representada mediante una escala cromática: colores verde oscuros indican mayor dureza, mientras que tonos azul oscuros corresponden a granos más blandos.

A diferencia de lo reportado por Singh et al. (2010), quienes lograron reducir el tiempo de maceración a 16 horas y la concentración de SO_2 a 600 ppm mediante el uso de proteasas y ajustes específicos en el pH del medio, los resultados de este estudio no muestran mejoras tan marcadas al emplear proteasa. La diferencia fundamental entre ambos trabajos radica en la estrategia de control del pH, mientras Singh et al. (2010) adaptaron el entorno a las condiciones óptimas de la enzima, este estudio mantuvo el pH característico del proceso industrial (≈3,7), generado por la presencia de SO_2. Este valor se encuentra fuera del rango óptimo de actividad hidrolítica de la proteasa (pH 5,5–9,0) (UniProt, 2025c), lo que limita la eficiencia catalítica de la proteasa. Ajustar el pH para favorecer la actividad enzimática implicaría un uso intensivo de agentes químicos, incrementando significativamente los costos operativos y la complejidad del proceso, razón por la cual no se consideró viable en condiciones industriales. Esta limitación ha sido señalada también por Ozturk et al. (2021b), quienes destacan que la efectividad de las proteasas depende de la compatibilidad con el pH del medio, y por Kaur et al. (2024), quienes reportan que la estabilidad funcional de proteasas industriales se reduce drásticamente en entornos ácidos.

8.2.2. Celulasa

Al igual que los modelos previamente analizados, el modelo estadístico correspondiente a la celulasa proveniente de Trichoderma reesei (Tabla 5) resultó altamente significativo ($F = 68,52$; $p < 0,001$) (Fila 1), lo que confirma su capacidad para explicar de manera robusta la variabilidad en la dureza del grano. Entre los factores principales, el tiempo de maceración mostró el mayor efecto ($F = 358,54$) (Fila 3), seguido por la concentración de SO_2 ($F = 158,96$) (Fila 4) y la dosis de celulasa ($F = 54,44$) (Fila 5), todos con $p < 0,001$. Se identificaron efectos cuadráticos significativos para SO_2 y celulasa (Filas 8 y 9), lo que indica la presencia de puntos óptimos para ambos factores, mientras que el tiempo presentó un comportamiento predominantemente lineal (Fila 7). Asimismo, las interacciones tiempo–SO_2 ($F = 5,25$; $p < 0,05$) (Fila 11) y tiempo–celulasa ($F = 4,10$; $p < 0,05$) (Fila 12) fueron relevantes, evidenciando que la eficacia de la enzima depende tanto del tiempo de tratamiento como del nivel de SO_2. En contraste, la interacción SO_2–celulasa no mostró significancia estadística ($p > 0,05$) (Fila 13) (Kuehl, 2000).

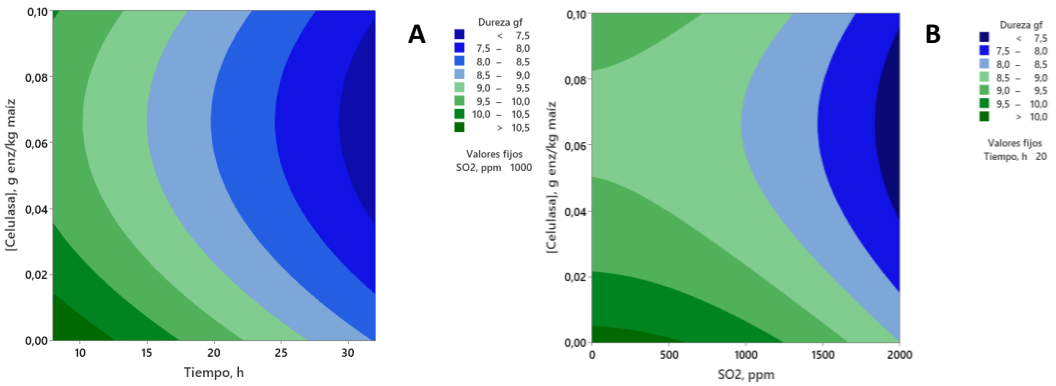
Aunque el análisis de varianza no indica una interacción significativa entre la concentración de celulasa y SO_2 ($p > 0,05$) (Tabla 5), los resultados experimentales evidencian que el tratamiento con 0,06 g de celulasa/kg de maíz, en presencia de 1000 ppm de SO_2 y un tiempo de maceración de 25 horas (Figura 11A), permite alcanzar valores de dureza entre 8,0 gf y 7,5 gf. Estos valores son comparables a los obtenidos mediante el proceso industrial convencional, que requiere aproximadamente 32 a 40 horas y 2000 ppm de SO_2 para lograr durezas similares. Esta diferencia se explica porque el tiempo de maceración ($F = 358,54$; $p < 0,001$) y la dosis de celulasa ($F = 54,44$; $p < 0,001$) son los factores más influyentes, lo que confirma que la reducción de dureza depende principalmente de la duración del tratamiento y la acción enzimática, más que de la interacción directa entre la enzima y el SO_2 (Kuehl, 2000).

Tabla 5. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la celulasa sobre la dureza del grano de maíz

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
1	Modelo	9	249,308	27,701	68,52	0,000
2	Lineal	3	229,458	76,486	189,19	0,000
3	Tiempo	1	144,948	144,948	358,54	0,000
4	SO_2	1	64,263	64,263	158,96	0,000
5	[Celulasa]	1	22,007	22,007	54,44	0,000
6	Cuadrado	3	15,826	5,275	13,05	0,000
7	Tiempo*Tiempo	1	0,167	0,167	0,41	0,521
8	SO_2*SO_2	1	4,809	4,809	11,90	0,001
9	[Celulasa]*[Celulasa]	1	10,850	10,850	26,84	0,000
10	Interacción de 2 factores	3	4,016	1,339	3,31	0,022
11	Tiempo*SO_2	1	2,122	2,122	5,25	0,024
12	Tiempo*[Celulasa]	1	1,656	1,656	4,10	0,045
13	SO_2*[Celulasa]	1	0,238	0,238	0,59	0,444
14	Error	134	54,172	0,404		
13	Falta de ajuste	26	39,068	1,503	1,04	0,000
16	Error puro	108	15,104	0,140		
17	Total	143	303,480			

Por otra parte, la Figura 11 *B* muestra que al incrementar la concentración de SO_2 a 1500 ppm, manteniendo la misma dosis de celulasa, es posible reducir el tiempo de maceración a 20 horas sin comprometer la dureza final del grano. Este hallazgo evidencia que la optimización del proceso mediante un ajuste moderado en la concentración de SO_2, combinado con la acción enzimática, permite disminuir significativamente el tiempo de operación y el uso de químicos en comparación con el método convencional. Estos resultados son coherentes con lo reportado por Ozturk et al. (2021a), quienes demostraron que la hidrólisis de la celulosa en la fibra de maíz presenta un efecto significativo sobre el proceso de maceración del maíz.

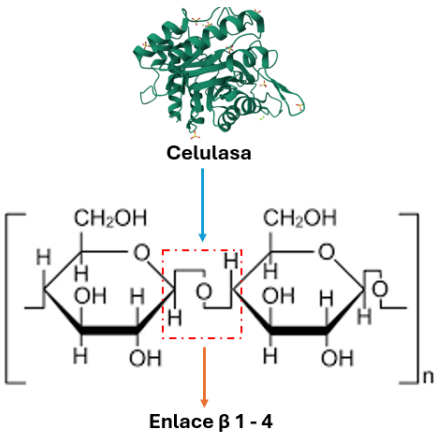
Figura 11. Efecto de la celulasa en la dureza del grano de maíz durante la maceración



Nota. Donde **A)** Interacción entre la concentración de la dosis de celulasa (eje Y, g de enzima / kg de maíz) y el tiempo de maceración (eje X, en horas) con concentración constante de SO_2 a 1000 ppm; **B)** Interacción entre la concentración de la dosis de celulasa (eje Y, g de enzima / kg de maíz) la concentración de SO_2 (eje X, en ppm) a 20 horas de tratamiento. La dureza de los granos de maíz (expresada en gf) la cual es representada mediante una escala cromática: colores verde oscuros indican mayor dureza, mientras que tonos azul oscuros corresponden a granos más blandos.

El efecto entre la celulasa y el SO_2 (Figura 11B) se explica por sus mecanismos de acción complementarios sobre los compuestos estructurales del grano de maíz principalmente la celulosa y las proteínas. La celulasa cataliza la ruptura de enlaces β-1,4-glucosídicos en la celulosa (Figura 12), debilitando la estructura fibrosa del pericarpio y la matriz del endospermo (Bazán-Colque et al., 2023; Gutiérrez-Rojas et al., 2015). Paralelamente, el SO_2 actúa sobre los enlaces disulfuro presentes en las proteínas de la matriz proteica, promoviendo su solubilización (Obadi, Qi & Xu, 2023). Esta matriz proteica, compuesta principalmente por zeínas y otras proteínas del endospermo vítreo, encapsulan los gránulos de almidón y los mantiene adheridos a la fibra (Ozturk et al., 2021b; Singh et al., 2023).

Figura 12. Acción de la celulasa sobre el enlace enlaces β-1,4-glucosídicos en la celulosa



Nota. Elaborado a partir de Bazán-Colque et al. (2023)

Por tanto, la ruptura de enlaces disulfuro por el SO_2 desestabiliza esta red proteica, mientras que la hidrólisis de la celulosa por la celulasa fragmenta la estructura polisacárida que refuerza la fibra. La combinación de ambos efectos incrementa la permeabilidad del grano y facilita la liberación de almidón y proteína, reduciendo significativamente la dureza. Esta interacción sinérgica ha sido documentada en estudios sobre molienda húmeda, donde se señala que la integridad del endospermo depende de la asociación proteína-celulosa, y que su desestructuración simultánea mejora la eficiencia del proceso (Li et al., 2023; Ramírez et al., 2009).

A diferencia de la proteasa, cuya actividad se ve limitada por el pH ácido del medio de maceración (3,7), la celulasa utilizada en este estudio mantiene su actividad hidrolítica en un rango de pH entre 3,5 y 6,0 (UniProt, 2025a), lo que la hace compatible con las condiciones industriales de este proceso. Este aspecto representa una ventaja operativa importante, ya que evita la necesidad de ajustes químicos costosos en el pH del sistema.
Además, los resultados obtenidos son consistentes con los reportes de Bazán-Colque et al. (2023), quienes señalaron que la celulosa representa aproximadamente el 19% de la composición de la fibra de maíz. La hidrólisis de este componente contribuye directamente a la reducción de la dureza del grano y a la liberación de almidón, mejorando la eficiencia del proceso de molienda húmeda.

8.2.3. Hemicelulasa

El modelo estadístico correspondiente a la hemicelulasa producida por *Aspergillus kawachii* sobre la dureza del grano de maíz durante el proceso de maceración resultó altamente significativo (F = 105,46; p < 0,001) (Fila 1), lo que confirma su capacidad para explicar de manera robusta la variabilidad en la dureza del grano. Entre los factores principales, el tiempo de maceración mostró el mayor efecto (F = 405,63) (Fila 3), seguido por la concentración de SO_2 (F = 265,40) (Fila 4) y la dosis de hemicelulasa (F = 137,84) (Fila 5), todos con p < 0,001, evidenciando su influencia crítica en el proceso.
Se identificaron efectos cuadráticos significativos para SO_2 y hemicelulasa (F = 54,49 y 59,41 respectivamente) (Fila 8 y 9), lo que indica la existencia de puntos óptimos para ambos factores, mientras que el tiempo presentó un comportamiento predominantemente lineal (F = 1,44, p > 0,05) (Fila 7). Asimismo, las interacciones tiempo–SO_2 y SO_2–hemicelulasa (F = 8,80 y 8,87, respectivamente p < 0,01) (Fila 11 y 13) fueron relevantes, sugiriendo que la eficacia del tratamiento depende tanto del tiempo como de la combinación de SO_2 y enzima. En contraste, la interacción tiempo–hemicelulasa mostró un efecto menor pero significativo (F = 10,64, p ≈ 0,02) (Fila 12) (Kuehl, 2000). Este comportamiento confirma que la hemicelulasa, en sinergia con SO_2, contribuye de manera sustancial a la reducción de la dureza del grano, y que la optimización del proceso requiere ajustar simultáneamente tiempo, concentración de SO_2 y dosis enzimática para maximizar la eficiencia.

Tabla 6. Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta para evaluar el efecto de la hemicelulasa sobre la dureza del grano de maíz

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
1	Modelo	9	290,215	32,246	105,46	0,000
2	Lineal	3	245,060	81,687	267,16	0,000
3	Tiempo	1	124,027	124,027	405,63	0,000
4	SO_2	1	81,151	81,151	265,40	0,000
5	[Hemicelulosa]	1	42,148	42,148	137,84	0,000
6	Cuadrado	3	35,269	11,756	38,45	0,000
7	Tiempo*Tiempo	1	0,441	0,441	1,44	0,232
8	SO_2*SO_2	1	16,661	16,661	54,49	0,000
9	[Hemicelulosa]*[Hemicelulosa]	1	18,166	18,166	59,41	0,000
10	Interacción de 2 factores	3	3,569	1,190	3,89	0,011
11	Tiempo*SO_2	1	0,857	0,857	8,80	0,006
12	Tiempo*[Hemicelulosa]	1	0,000	0,000	10,64	0,022
13	SO_2*[Hemicelulosa]	1	2,713	2,713	8,87	0,003
14	Error	134	40,972	0,306		
15	Falta de ajuste	26	23,852	0,917	5,79	0,000
16	Error puro	108	17,121	0,159		
17	Total	143	331,187			

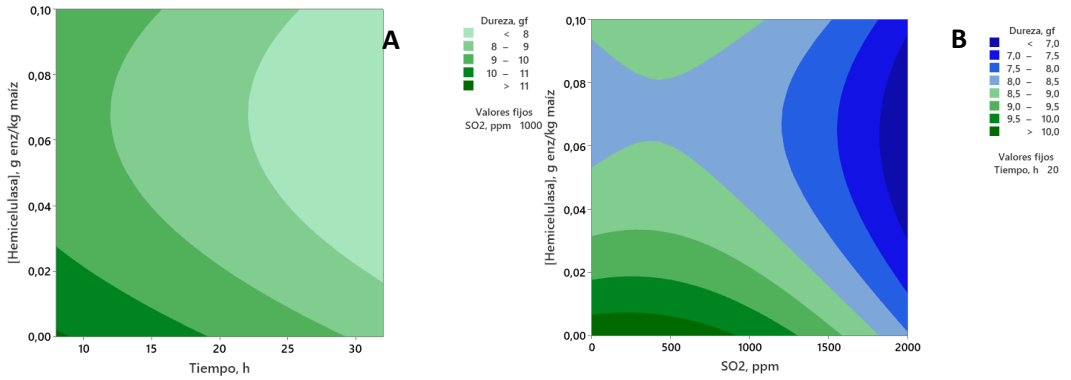
La aplicación de hemicelulasa a una concentración de 0,06 g/kg de maíz, en presencia de 1000 ppm de SO_2, permitió alcanzar durezas inferiores a 8 gf tras 23 horas de maceración (Figura 13A). Estos valores son comparables con los obtenidos mediante maceración convencional durante 32 horas con 2000 ppm de SO_2 (Figura 9), lo que evidencia el potencial de esta enzima para reducir tanto el tiempo de proceso como la concentración de SO_2 sin comprometer la eficiencia del ablandamiento. Sin embargo, la Figura 13A

también muestra que, en ausencia de SO_2, incluso con dosis más altas de hemicelulasa, las durezas se mantienen entre 8 y 8,5 gf, lo que indica que la acción enzimática por sí sola no logra alcanzar la textura requerida para la separación eficiente de almidón y proteína. Este comportamiento sugiere que la hemicelulasa debilita la matriz fibrosa, pero no desestructura completamente la red proteica que encapsula los gránulos de almidón en la fibra.

Por ello, la sinergia entre hemicelulasa y SO_2 observada en la Figura 13B, donde se alcanzan durezas menores a 7,0 gf en 20 horas usando una concentración de 1900 ppm de SO_2, resulta crítica para alcanzar las durezas del maíz similares a las obtenidas en el proceso industrial convencional (7,6 gf). Esto es debido a que mientras la hemicelulasa cataliza la ruptura de enlaces glucosídicos α-1,2, α-1,3 y α-1,5 en las cadenas de hemicelulosa (Bazán-Colque et al., 2023; Gutiérrez-Rojas et al., 2015), el SO_2 actúa sobre los enlaces disulfuro de las proteínas estructurales, facilitando su solubilización (Obadi, Qi & Xu, 2023). Esta combinación debilita simultáneamente la matriz polisacárida y proteica, promoviendo una mayor permeabilidad y reducción de la dureza, condición indispensable para la liberación eficiente de almidón y proteína en etapas posteriores.

A demás, cabe destacar que la hemicelulasa utilizada en este estudio presenta una actividad óptima en un rango de pH entre 3,5 y 7,0 (UniProt, 2025b), lo que la hace compatible con las condiciones industriales típicas de maceración, donde el pH se mantiene alrededor de 3,7. Esta característica representa una ventaja operativa frente a otras enzimas como la proteasa, cuya actividad se ve limitada en ambientes ácidos.

Figura 13. Efecto de la hemicelulasa en la dureza del grano de maíz durante la maceración



Nota. Donde **A)** Interacción entre la concentración de la dosis de hemicelulasa (eje Y, g de enzima / kg de maíz) y el tiempo de maceración (eje X, en horas) con concentración constante de SO_2 a 1000 ppm; **B)** Interacción entre la concentración de la dosis de hemicelulasa (eje Y, g de enzima / kg de maíz) la concentración de SO_2 (eje X, en ppm) a 20 horas de tratamiento. La dureza de los granos de maíz (expresada en gf) la cual es representada mediante una escala cromática: colores verde oscuros indican mayor dureza, mientras que tonos azul oscuros corresponden a granos más blandos.

En estudios previos, como el de Singh et al. (2010), se propuso el uso de proteasas en combinación con ajustes de pH para mejorar la eficiencia de la maceración. Sin embargo, dicha estrategia requiere una etapa de molienda previa y condiciones de pH más alcalinas, lo que implica mayores costos operativos y complejidad en la implementación. Otros trabajos, como los de Ozturk et al. (2021a) y Li et al. (2023), han evaluado el uso de hemicelulasas para incrementar la liberación de almidón y proteína en la fibra de maíz, principalmente en etapas posteriores al remojo o bajo condiciones controladas fuera del flujo convencional. En contraste, el presente estudio demuestra que la hemicelulasa puede operar eficazmente durante la maceración, sin necesidad de modificar el pH del medio (≈3,7) ni alterar la secuencia tradicional del proceso industrial, lo que representa una ventaja significativa en términos de costos y viabilidad operativa.

Los resultados obtenidos pueden explicarse a partir de la composición estructural de la fibra del maíz, constituida principalmente por hemicelulosa (≈48%), celulosa (≈19%) y proteínas (≈14%) (Bazán-Colque et al., 2023). Esta matriz compleja determina la resistencia mecánica del grano y, por tanto, la eficiencia del proceso de maceración. Al analizar las tres enzimas evaluadas (proteasa, celulasa y hemicelulasa) se evidencia que todas contribuyen a reducir la dureza del grano, aunque mediante mecanismos y eficiencias diferenciadas. La proteasa mostró limitaciones operativas debido a su baja actividad en condiciones de pH ácido (≈3,7), propias del medio de maceración, lo que restringe su aplicabilidad directa sin ajustes adicionales. En contraste, la celulasa demostró alta compatibilidad con el pH del proceso y una capacidad significativa para reducir tiempos y concentración de SO_2, gracias a su acción sobre la celulosa, componente que aporta rigidez a la fibra. Por su parte, la hemicelulasa presentó el mayor impacto en la desestructuración de la matriz fibrosa, favoreciendo la liberación de almidón y proteína, especialmente cuando actúa en sinergia con SO_2 (Ozturk et al. 2021b). Esta combinación permitió alcanzar durezas inferiores a 7 gf en menos de 20 horas, lo que representa una mejora sustancial frente a la maceración convencional.

En conjunto, estos hallazgos no solo confirman la viabilidad del uso de enzimas como estrategia biotecnológica para reducir el uso de SO_2 y los tiempos de maceración del maíz, sino que también proporcionan información clave para definir condiciones óptimas en tratamientos combinados, aspecto que se aborda en el apartado 8.4.

8.3. Análisis estructural de la fibra de maíz

El análisis microscópico de la fibra de maíz tratada con diferentes enzimas revela alteraciones significativas en la microestructura del tejido vegetal, las cuales están directamente relacionadas con la reducción de la dureza del grano observada en los ensayos previos. En la Figura 14, se presentan las micrografías correspondientes a los tratamientos con SO_2, proteasa, celulasa y hemicelulasa, permitiendo una comparación visual de los efectos de cada tratamiento sobre la integridad de la fibra.

La muestra tratada únicamente con SO_2 (Figura 14A) muestra una estructura fibrosa compacta, con presencia evidente de proteínas estructurales y gránulos de almidón adheridos. Este resultado es coherente con lo reportado por Ozturk et al. (2021b), quienes identificaron que la matriz proteica del endospermo vítreo periférico actúa como barrera física, reteniendo los gránulos de almidón dentro de la fracción de fibra.

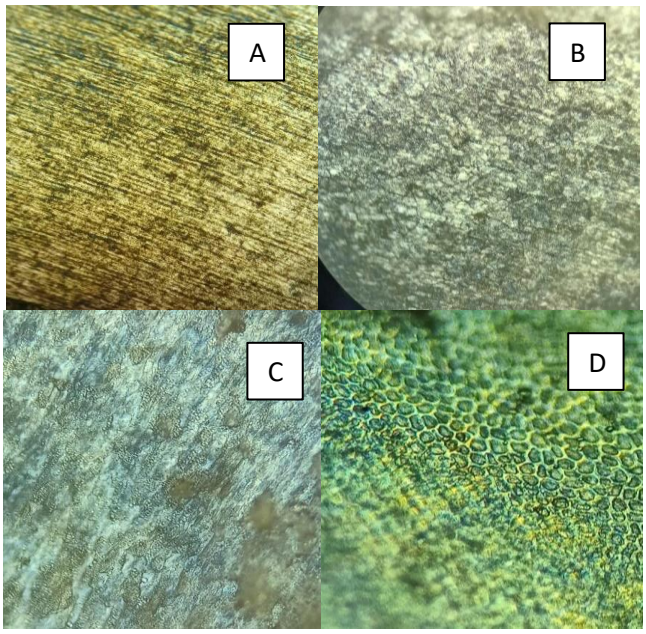
En contraste, la muestra tratada con proteasa de *Bacillus subtilis* (Figura 14B) presenta una reducción en el contenido proteico de la fibra, aunque aún se observan gránulos de almidón parcialmente adheridos. Esta observación sugiere que, si bien la proteasa logra hidrolizar enlaces peptídicos, su eficiencia está limitada por el pH ácido del medio de maceración (3,7), el cual se encuentra fuera del rango óptimo de actividad de esta enzima (pH 5,5–9,0) (UniProt, 2025c). Este fenómeno ha sido descrito por Singh et al. (2023). En este contexto, diversos autores como Singh et al. (2010, 2023) recomiendan realizar una etapa de molienda previa a la adición de la proteasa, con el fin de mejorar la accesibilidad enzimática y optimizar la degradación proteica. Pese a ello, esta metodología implicaría un incremento considerable en los costos operativos debidos a la necesidad de implementar un reactor de alta capacidad que permita mantener los tiempos de reacción requeridos para la interacción eficiente entre la enzima y el maíz, considerando además los grandes volúmenes de maíz procesados diariamente en este tipo de plantas, que suelen oscilar entre 1.000 y 5.000 toneladas por día (Singh & Johnston, 2002).

La muestra tratada con celulasa de *Trichoderma reesei* (Figura 14C) muestra una estructura más porosa y menos compacta, con menor presencia de proteína estructural. Sin embargo, aún se observan gránulos de almidón adheridos, lo que indica que la hidrólisis de la celulosa que representa aproximadamente el 19% de la fibra de maíz (Bazán-Colque et al., 2023) no es suficiente por sí sola para liberar completamente el almidón encapsulado. Este resultado coincide con lo reportado por Gutiérrez-Rojas et al. (2015), quienes destacaron que la celulosa forma microfibrillas resistentes que requieren condiciones específicas para su completa degradación.

Por último, la muestra tratada con hemicelulasa de Aspergillus kawachii (Figura 14D) presenta una matriz fibrosa altamente desestructurada, con poros bien definidos y ausencia de gránulos de almidón adheridos. Este resultado sugiere una hidrólisis efectiva de la hemicelulosa, componente que constituye cerca del 48% de la fibra del grano de maíz (Bazán-Colque et al., 2023). La acción de la hemicelulasa sobre los enlaces glucosídicos α-1,2, α-1,3 y α-1,5 permite una ruptura más eficiente de la matriz de polisacáridos, facilitando la liberación de almidón y proteína. Este mecanismo ha sido ampliamente documentado por Li et al. (2023) y Miyanaga et al. (2004), quienes demostraron que la α-L-arabinofuranosidasa posee alta especificidad por los arabinoxilanos presentes en la hemicelulosa del maíz.

Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan la hipótesis de que la estructura de la fibra de maíz es un factor determinante en la eficiencia del proceso de maceración, y que su modificación mediante enzimas específicas puede mejorar significativamente la liberación de componentes de interés industrial (Singh et al., 2023). No obstante, es importante considerar que la eficiencia de cada enzima está condicionada por factores como el pH, la temperatura y la accesibilidad al sustrato, lo que implica la necesidad de optimizar las condiciones operativas para cada tipo de tratamiento (Cremonesi, 2002).

Figura 14. Estructura de fibra de maíz después de los diferentes tratamientos



Nota. Las muestras fueron tratadas durante 32 horas y 2000 ppm de SO_2 Donde **A)** Tratamiento sin enzima; **B)** Tratamiento con 0,2 g de proteasa de *Bacillus subtilis* por kilogramo de maíz; **C)** tratamiento con 0,06 g de celulasa por kg de maíz y **D)** Tratamiento con 0,06 g de hemicelulasa por kg de maíz.

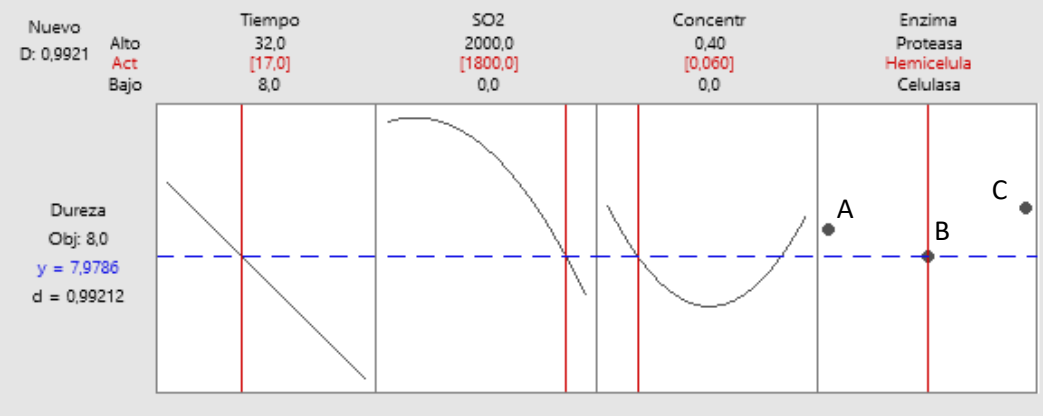
8.4. Condiciones de proceso para el uso combinado de las enzimas proteasa, celulasa y hemicelulasa en la maceración de maíz

Con base en los resultados experimentales y en el análisis de los modelos de superficie de respuesta presentados en los apartados 8.2, se identificaron las condiciones óptimas para el proceso de maceración (Figura 15), priorizando la reducción del tiempo de tratamiento y la concentración de dióxido de azufre (SO_2), sin comprometer la eficiencia del ablandamiento del grano. Las condiciones óptimas determinadas fueron: 17 horas de maceración, 1800 ppm de SO_2, evaluando dos combinaciones de enzimas:

1. Celulasa + Hemicelulasa + Proteasa (0,06 g/kg de celulasa, 0,06 g/kg de hemicelulasa y 0,2 g/kg de proteasa).
2. Celulasa + Hemicelulasa (0,06 g/kg cada una), excluyendo la proteasa.

Estas combinaciones fueron seleccionadas debido a que la primera corresponde a la configuración completa propuesta como resultado del modelo estadístico de optimización, mientras que la segunda combinación constituye una alternativa diseñada para minimizar la solubilización excesiva de proteína asociada al uso de proteasa, fenómeno que podría comprometer la recuperación de proteína de en etapas posteriores. La recuperación de proteína, al igual que la de almidón, es un aspecto importante en el proceso de molienda húmeda de maíz, dado que la proteína es un coproducto de alto valor comercial. Su aprovechamiento eficiente impacta directamente la rentabilidad del proceso pues la proteína recuperada es ampliamente utilizada en alimentación animal y otras aplicaciones industriales (Ramírez et al., 2009).

Figura 15. Parámetros óptimos de maceración de maíz según modelo de superficie de respuesta



Nota. Donde **A)** Celulasa; **B)** Hemicelulasa y **C)** Proteasa. La línea punteada de color azul indica el valor objetivo de dureza, el cual se muestra en el eje **Y** ubicado en la parte izquierda de cada gráfico. En la parte superior de la figura se presentan los parámetros recomendados para la aplicación de las enzimas bajo las condiciones óptimas determinadas por el modelo.

8.5. Recuperación de almidón y proteína

Dado que el proceso de extracción puede conllevar pérdidas de almidón y proteína durante el lavado, se cuantificó la concentración de ambos componentes retenidos en la fibra de maíz después de esta etapa, asegurando la fiabilidad de los datos obtenidos.

8.5.1. Almidon

Los resultados de la Tabla 7 muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de almidón retenido en la fibra entre los tratamientos enzimáticos y el proceso convencional (36 horas, 2000 ppm de SO_2). Este hallazgo es consistente con lo reportado por Ramírez et al. (2009), quienes indicaron que el uso de enzimas puede mantener o incluso mejorar la eficiencia de recuperación de almidón sin comprometer su calidad, siempre que se optimicen las condiciones de reacción.

Tabla 7. Comparación de Tukey para concentración de almidón retenido en fibra de maíz macerado con dos combinaciones de tratamientos enzimáticos, tiempo de maceración de 17 horas y 1800ppm de SO_2 frente muestra patrón

Muestra	Almidon en fibra, %	Agrupación
Hemicelulasa+Celulasa	15,97 ± 0,50	A
Hemicelulasa+Celulasa+Proteasa	15,47 ± 0,78	A
Muestra patrón	14,87 ± 0,86	A

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. La muestra patrón fue tomada de un proceso industrial de molienda húmeda de maíz con 36 horas de maceración y 2000 ppm de SO_2.

La concentración de almidón en la fibra osciló entre 14,87% y 15,97%, valores que se encuentran dentro del rango típico observado en procesos industriales de molienda húmeda (14–16%), según Singh et al. (2023). Esto sugiere que el tratamiento enzimático no afecta negativamente la liberación de almidón, incluso cuando se reduce el tiempo de maceración en un 53% y la concentración de SO_2 en un 10%.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Singh et al., (2010) el cual logró reducir los tiempos de maceración a 16 horas y el uso de SO_2 a 1600 ppm mediante el uso de proteasas y Ozturk et al. (2021) quien logró reducir los tiempos de maceración y las concentraciones de SO_2 mediante el uso de hemicelulasas y proteasas. Sin embargo, estos autores proponían realizar una primera etapa de molienda para posteriormente adicionar las enzimas garantizando tiempos de reacción entre las 4 y 6 horas. La implementación del enfoque planteado por estos autores requeriría una inversión adicional en un tanque de reacción con capacidad suficiente para garantizar los tiempos de contacto enzimático requeridos. No obstante, los resultados del presente trabajo demuestran que es posible alcanzar las reducciones en tiempos de maceración y SO_2 mencionados anteriormente sin necesidad de realizar una molienda previa, lo que representa una ventaja significativa en términos de eficiencia operativa y costos de infraestructura.

En cuanto a la calidad funcional del almidón, los resultados del viscoamilograma (Tabla 8) indican que no hubo diferencias significativas en la temperatura de gelatinización, viscosidad máxima ni viscosidad final entre los tratamientos enzimáticos y el convencional. Estos parámetros son indicadores claves para evaluar el grado de alteración del almidón y de su comportamiento reológico durante el procesamiento (Dokić et al., 2010; Salinas et al., 2003). La similitud en estos valores sugiere que las enzimas utilizadas no poseen actividad amilolítica significativa, lo cual es deseable para preservar la funcionalidad del almidón en las diferentes aplicaciones.

Tabla 8. Perfil amilográfico de almidón con tratamiento enzimático y muestra patrón

	Temp inicial de gelatinización, °C	**Viscosidad Max, BU**	**Viscosidad Final, BU**
Muestra patrón	73,6	249	295
Hemicelulas+Celulasa	73,1	251	302
Hemicelulasa+Celulasa+Proteasa	73,4	252	300

Nota. BU: Unidades Brabender. La muestra patrón fue tomada de un proceso industrial de molienda húmeda de maíz con 36 horas de maceración y 2000 ppm de SO_2.

8.5.2. Proteína

Respecto a la concentración de proteína en la fibra, al igual que la concentración de almidón, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 9). Sin embargo, se evidenció una reducción del 4 % en el contenido de proteína en la fibra del tratamiento que combinó celulasa, hemicelulasa y proteasa, indicando una mayor liberación de proteína. Estos valores son comparables con valores obtenidos del proceso industrial convencional el cual oscila entre 10% y 13% de proteína en fibra.

Tabla 9. Comparación de Tukey para concentración de proteína retenida en la fibra en tratamientos con enzima y tiempo de maceración de 17 horas y muestra patrón

Muestra	Proteína en fibra, %	Agrupación
Hemicelulasa+Celulasa	12,60 ± 1,21	A
Hemicelulasa+Celulasa+Proteasa	11,53 ± 0,95	A
Muestra patrón	12,07 ± 1,50	A

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. La muestra patrón fue tomada de un proceso industrial de molienda húmeda de maíz con 36 horas de maceración y 2000 ppm de SO_2.

Los resultados obtenidos demuestran que el uso de tratamientos enzimáticos propuestos en este estudio permite alcanzar niveles equivalentes de retención de almidón y proteína en la fibra de maíz, comparables a los obtenidos mediante procesos convencionales. Esto indica que la recuperación de estos compuestos no se ve comprometida, a pesar de reducir el tiempo de maceración de 36 a 17 horas (una disminución del 53%) y la concentración de dióxido de azufre (SO_2) de 2000 ppm a 1800 ppm (una reducción del 10%), lo que representa una mejora significativa en la eficiencia del proceso de maceración de maíz.
Estas optimizaciones no solo implican beneficios en términos de eficiencia energética, debido a la reducción del tiempo de operación, sino que también contribuyen a la sostenibilidad del proceso al disminuir el uso de SO_2, un agente químico asociado a riesgos ambientales. La reducción en su concentración minimiza el potencial de emisiones atmosféricas, lo que favorece el cumplimiento de normativas ambientales y mejora el perfil ecológico del proceso de molienda húmeda (Ramírez et al., 2009).

Por otro lado, al evaluar el efecto del uso de la proteasa en la maceración de maíz, se evidenció un incremento significativo en la concentración de proteína disuelta en el agua de maceración correspondiente al tratamiento con proteasa (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de Tukey para concentración de proteína en agua de maceración en tratamientos con enzima, tiempo de maceración de 17 horas y muestra patrón

Muestra	Proteína en agua de maceración, %	Agrupación
Hemicelulasa+Celulasa	2,39 ± 0,38	A
Hemicelulasa+Celulasa+Proteasa	4,55 ± 0,45	B
Muestra patrón	2,15 ± 0,18	A

Nota. Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. La muestra patrón fue tomada de un proceso industrial de molienda húmeda de maíz con 36 horas de maceración y 2000 ppm de SO_2.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con proteasa favorece la hidrólisis de las proteínas del maíz, generando péptidos de menor peso molecular y aumentando su solubilidad (Kaur, Huppertz & Vasiljevic, 2024). Esta mayor solubilidad representa una

limitación relevante en el contexto de la molienda húmeda de maíz, ya que el incremento de proteína soluble en el almidón puede afectar negativamente procesos industriales donde se emplea como materia prima, uno de estos procesos es la producción de jarabes de maíz, donde se compromete la estabilidad del color del producto final.

Adicionalmente, la proteína constituye uno de los coproductos de interés comercial en este tipo de procesos. El aumento de su solubilidad dificulta su recuperación en etapas posteriores, incrementando su pérdida en las corrientes líquidas del proceso lo que afecta negativamente los rendimientos de recuperación de proteína.

Como resultado de los análisis realizados, el tratamiento más eficiente corresponde a la combinación enzimática que emplea 0,06 g de celulasa y 0,06 g de hemicelulasa por kg de maíz. Este tratamiento no afecta negativamente la recuperación ni las propiedades funcionales de la proteína ni del almidón, lo que lo convierte en una alternativa viable frente a los métodos convencionales. Además, permite reducir significativamente el tiempo de maceración y la concentración de SO_2 utilizada en el proceso.

Aunque el uso de enzimas implica un costo adicional frente a la maceración convencional, el proceso de maceración de la molienda enzimática de maíz planteado bajo los parámetros establecidos en este estudio presenta un costo total similar al método tradicional. Esto se debe al ahorro energético derivado del menor tiempo de maceración y a la reducción en el uso de productos químicos, factores que compensan el gasto inicial en enzimas. Como resultado, la diferencia económica entre ambos métodos es mínima, siendo el proceso enzimático un 0,8 % más económico que la maceración convencional. Si bien la diferencia en costos no es significativa, se ve compensada por los beneficios operativos obtenidos, como la disminución del consumo energético asociado a la reducción del tiempo de maceración y el menor uso de SO_2. Adicionalmente, el tratamiento enzimático incrementa la productividad al permitir procesar mayores volúmenes de maíz, en comparación con la maceración convencional (Ramírez et al., 2009).

9. Conclusiones

- La aplicación de enzimas proteasa, celulasa y hemicelulasa comerciales, en presencia de dióxido de azufre (SO_2), favorece la reducción de la dureza del grano de maíz durante la maceración. Este enfoque enzimático genera efectos sinérgicos que permiten alcanzar texturas comparables a las obtenidas mediante procesos convencionales de molienda húmeda, pero en tiempos significativamente menores, lo que representa una mejora sustancial en la eficiencia operativa del proceso.

- Entre las enzimas estudiadas, la celulasa mostró mayor compatibilidad con las condiciones industriales (pH ácido) y una alta eficiencia en la reducción de la dureza del grano. La hemicelulasa, aunque ligeramente menos eficiente en algunas condiciones, demostró una fuerte sinergia con el SO_2, favoreciendo la desestructuración de la fibra. Por su parte, la proteasa, si bien facilitó la solubilización de proteínas, presentó limitaciones operativas por su baja actividad en medios ácidos, lo que podría afectar su aplicabilidad industrial sin ajustes adicionales.

- El análisis comparativo de los tratamientos enzimáticos aplicados durante la maceración del maíz evidencia que la combinación compuesta por 0,06 kg de hemicelulasa y 0,06 kg de celulasa por tonelada de maíz representa la estrategia más eficiente y compatible con las condiciones industriales actuales. Esta combinación permite una reducción significativa del tiempo de maceración a 17 horas y 1800 ppm de dióxido de azufre (SO_2) representado en un 53% y 10% respectivamente, sin comprometer la calidad funcional del almidón. Indicando que esta metodología representa una alternativa biotecnológica viable y sostenible frente al proceso convencional, al disminuir el consumo energético y las emisiones contaminantes asociadas al uso intensivo de SO_2.

- El tratamiento con proteasa mostró un incremento significativo en la solubilidad de la proteína en el agua de maceración, este fenómeno representa una limitación para la recuperación eficiente de este coproducto, además de potenciales afectaciones en procesos posteriores que utilicen el almidón como materia prima

- Si bien el uso de enzimas implica un costo adicional, el costo total del tratamiento enzimático resulta similar al convencional, lo que confirma que esta alternativa es económicamente competitiva y operativamente más eficiente para la molienda húmeda de maíz.

10. Bibliografía

Bazán-Colque, R. J., Ramirez Ascheri, J. L., Ruiz-Barreto, F. I., & Ramirez Ascheri, D. P. (2023). Investigation of the effect of particle size of corn fiber, as potential raw material, on techno-functional and physicochemical properties. *Journal of Cereal Science*, *112*, 103708. https://doi.org/10.1016/J.JCS.2023.103708

Corn Refiners Association (CRA). (n.d.-a). *About CRA | Corn Refiners Association*. Retrieved July 5, 2023, from https://corn.org/about-cra/

Corn Refiners Association (CRA). (n.d.-b). *Member Company Locations | Corn Refiners Association*. Corn Refiners Association [CRA]. Retrieved July 5, 2023, from https://corn.org/about-cra/member-company-locations/

Cremonesi P. (2002). *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome* (Prato - Padova, Ed.; II).

Dailey OD (2002) Effect of lactic acid on protein solubilization and starch yield in corn wet-mill steeping: a study of hybrid effects. Cereal Chem 79:257–260. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.2.257

Dokić, L., Dapčević, T., Krstonošić, V., Dokić, P., & Hadnađev, M. (2010). Rheological characterization of corn starch isolated by alkali method. *Food Hydrocolloids*, 24(2–3), 172–177. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.09.002

Dragos A., Kovacs A.T. 2020. Phage recombination drives evolution of spore-forming Bacilli. EMBL/GenBank/DDBJ. https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A6M4JIK0/publications

Erenstein, O., Jaleta, M., Sonder, K., Mottaleb, K., & Prasanna, B. M. (2022). Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. *Food Security*, *14*(5), 1295–1319. https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2024). *Nota informativa de la FAO sobre la oferta y la demanda de cereales | Situación Alimentaria Mundial | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/

García-González, G., González, G. M., & Palma-Nicolás, J. P. (2019). Las proteasas de serina bacterianas y su implicación en la fisiopatología de la infección. *Revista Del Laboratorio Clínico*, *12*(3), 137–146. https://doi.org/10.1016/j.labcli.2019.02.003

Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, *32*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009

Jackson, D. S., & Shandera, D. L. (1995). *Corn Wet Milling: Separation Chemistry and Technology* (pp. 271–300). https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)60085-6

Khan N. (2018). Enzyme Technology - An Emerging Trend in Biotechnology. *Enzyme Engineering*, *07*(01). https://doi.org/10.4172/2329-6674.1000163

Kaur, S., Huppertz, T., & Vasiljevic, T. (2024). Plant proteases and their application in dairy systems. *International Dairy Journal*, 154, 105925. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.105925

Kuehl, R. O. (2000). Design of experiments: statistical principles of research design and analysis. Duxbury/Thomson Learning.

Lee, T. M., Farrow, M. F., Arnold, F. H., Kaiser, J. T., & Mayo, S. L. (2011). Crystal structure of Cel5A (EG2) from Hypocrea jecorina (*Trichoderma reesei*) [PDB ID: 3QR3]. RCSB Protein Data Bank. https://doi.org/10.2210/pdb3QR3/pdb

Li, C., Cao, H., Wu, W., Meng, G., Zhao, C., Cao, Y., & Yuan, J. (2023). Expression and characterization of α-L-arabinofuranosidase derived from *Aspergillus awamori* and its enzymatic degradation of corn byproducts with xylanase. *Bioresource Technology*, 384, 129278. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129278

Mejia D. (2003). *MAIZE: Post-Harvest Operation*.

Meylinah S. (2022). This report contains assessments of commodity and trade issues made by usda staff and not necessarily statements of official u.s. government policy.

Miyanaga, A., Koseki, T., Matsuzawa, H., Wakagi, T., Shoun, H., Fushinobu. 2004. Crystal Structure of a Family 54 α-l-Arabinofuranosidase Reveals a Novel Carbohydrate-binding Module That Can Bind Arabinose. *Journal of Biological Chemistry*. 279. 10.1074/jbc.M405390200

Nelson, D. and Cox, M. (2008). PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY. 5ta edition. W.H. *Freeman and Company*. ISBN-13: 978-0-7167-7108-1

Obadi M., Qi Y. and Xu B. (2023). High-amylose maize starch: Structure, properties, modifications and industrial applications. *Carbohydrate Polymers*. 299. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120185

Orellano, P., Reynoso, J., & Quaranta, N. (2021). Short-term exposure to sulphur dioxide (SO_2) and all-cause and respiratory mortality: A systematic review and meta-analysis. *Environment International*, *150*, 106434. https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106434

Ozturk, O. K., Kaasgaard, S. G., Palmén, L. G., Vidal, B. C., & Hamaker, B. R. (2021a). Enzyme treatments on corn fiber from wet-milling process for increased starch and protein extraction. *Industrial Crops and Products*, *168*, 113622. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113622

Ozturk, O. K., Kaasgaard, S. G., Palmén, L. G., Vidal, B., & Hamaker, B. R. (2021b). Protein matrix retains most starch granules within corn fiber from corn wet-milling process. *Industrial Crops and Products*, *165*, 113429. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113429

Pupim, L. B., Martin, C. J., & Ikizler, T. A. (2013). Assessment of Protein and Energy Nutritional Status. In *Nutritional Management of Renal Disease*. Elsevier. 137–158. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391934-2.00010-2

Ramírez, E. C., Johnston, D. B., McAloon, A. J., & Singh, V. (2009). Enzymatic corn wet milling: engineering process and cost model. *Biotechnology for Biofuels*, *2*(1), 2. https://doi.org/10.1186/1754-6834-2-2

Rausch, K. D., & Eckhoff, S. R. (2016). Maize: Wet Milling. In *Encyclopedia of Food Grains* (pp. 467–481). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00239-4

Rausch, K. D., Hummel, D., Johnson, L. A., & May, J. B. (2019). Wet Milling: The Basis for Corn Biorefineries. In *Corn* (pp. 501–535). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811971-6.00018-8

Salinas M., Herrera C., J.A, Castillo, & Pérez, P. (2003). Cambios físico-químicos del almidón durante la nixtamalización del maíz en variedades con diferente dureza de grano. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53(2), 188-193. Recuperado en 02 de julio de 2025, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222003000200011&lng=es&tlng=es.

Singh, S., Bekal, S., Duan J., Singh V. (2023). Characterization and Comparison of Wet Milling Fractions of Export Commodity Corn Originating from Different International Geographical Locations. *Biosynthesis Nutrition Biomedical.* 75. https://doi.org/10.1002/star.202200280

Singh, V., & Johnston, D. B. (2002). Pasting Properties and Surface Characteristics of Starch Obtained from an Enzymatic Corn Wet-Milling Process. *Cereal Chemistry Journal*, *79*(4), 523–527. https://doi.org/10.1094/CCHEM.2002.79.4.523

Singh, V., Johnston, D. B., & Neoh, S. L. (2010). ORIGINAL RESEARCH: Enzymatic corn wet milling process: Enzyme optimization & commercial trial. *Industrial Biotechnology*, *6*(1), 34–40. https://doi.org/10.1089/ind.2010.6.034

Sun, Y., Xia, W., Tang, L., Xiu, Z., Jin, W., Wang, X., Tao, J., Liu, H., An, H., Li, Y., & Tong, Y. (2024). Effects of thermophilic and acidophilic microbial consortia on maize wet-milling steeping. *Bioresources and Bioprocessing*, *11*(1), 68. https://doi.org/10.1186/s40643-024-00783-3

Thalli Satyanarayana Deepak, T. S. D., & Padmanabhan Appukuttan Jayadeep, P. A. J. (2022). Prospects of Maize (Corn) Wet Milling By-Products as a Source of Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. *Food Technology and Biotechnology*, *60*(1), 109–120. https://doi.org/10.17113/ftb.60.01.22.7340

UniProt Consortium. (2025a). *Endoglucanase EG-II - Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)*. UniProtKB. https://www.uniprot.org/uniprotkb/P07982

UniProt Consortium. (2025b). *Alpha-L-arabinofuranosidase B - Aspergillus kawachii (strain NBRC 4308)*. UniProtKB. https://www.uniprot.org/uniprot/Q8NK89

UniProt Consortium. (2025c). Neutral metalloproteinase (UniProt ID: A0A6M4JIK0). UniProt. https://www.uniprot.org/uniprotkb/A0A6M4JIK0

Williams Angelica, & Hubbs Todd. (2024). *Feed Grain Supply Is Higher on Large Crops and Beginning Stocks*. Food and Agriculture Organization of the United Nations

11. Anexos

Anexo 1. Dureza del grano de maíz en función del tiempo de maceración, concentración de SO_2 y dosis de proteasa

Tiempo de maceración, h	SO_2, ppm	proteasa, g de enzima/kg de maíz	Dureza, gf
8	1000	0,4	10,19 ± 0,09
12	1000	0,4	9,68 ± 0,12
24	1000	0,4	9,22 ± 0,18
32	1000	0,4	8,50 ± 0,12
8	1000	0	10,95 ± 0,21
12	1000	0	10,50 ± 0,29
24	1000	0	10,15 ± 0,20
32	1000	0	8,70 ± 0,11
8	1000	0,1	10,30 ± 0,13
12	1000	0,1	9,55 ± 0,24
24	1000	0,1	9,48 ± 0,45
32	1000	0,1	8,50 ± 0,28
8	0	0,4	10,57 ± 0,39
12	0	0,4	9,49 ± 0,21
24	0	0,4	8,74 ± 0,35
32	0	0,4	7,66 ± 0,34
8	0	0	11,88 ± 0,35
12	0	0	11,05 ± 0,23
24	0	0	10,10 ± 0,67
32	0	0	9,24 ± 0,26
8	0	0,1	10,36 ± 0,21
12	0	0,1	9,68 ± 0,31
24	0	0,1	8,34 ± 0,33
32	0	0,1	7,46 ± 0,35
8	2000	0,4	9,92 ± 0,16
12	2000	0,4	8,22 ± 0,15
24	2000	0,4	7,70 ± 0,31
32	2000	0,4	7,58 ± 0,26
8	2000	0	8,99 ± 0,58
12	2000	0	8,20 ± 0,16
24	2000	0	7,47 ± 0,30
32	2000	0	7,12 ± 0,54
8	2000	0,1	9,35 ± 0,44
12	2000	0,1	8,20 ± 0,24
24	2000	0,1	7,45 ± 0,42
32	2000	0,1	7,21 ± 0,26

Anexo 2. Dureza del grano de maíz en función del tiempo de maceración, concentración de SO_2 y dosis de celulasa

Tiempo de maceración, h	SO_2, ppm	Celulasa, g de enzima/kg de maíz	Dureza, gf
8	1000	0,03	10,03 ± 0,40
12	1000	0,03	9,34 ± 0,28
24	1000	0,03	8,33 ± 0,16
32	1000	0,03	6,65 ± 0,13
8	1000	0	10,95 ± 0,21
12	1000	0	10,50 ± 0,29
24	1000	0	10,15 ± 0,20
32	1000	0	8,61 ± 0,28
8	1000	0,1	10,78 ± 0,43
12	1000	0,1	9,46 ± 0,32
24	1000	0,1	8,22 ± 0,63
32	1000	0,1	7,53 ± 0,39
8	0	0,03	10,81 ± 0,29
12	0	0,03	9,11 ± 0,26
24	0	0,03	8,70 ± 0,55
32	0	0,03	7,90 ± 0,59
8	0	0	11,88 ± 0,35
12	0	0	11,05 ± 0,23
24	0	0	10,10 ± 0,67
32	0	0	9,24 ± 0,26
8	0	0,1	10,87 ± 0,24
12	0	0,1	10,30 ± 0,37
24	0	0,1	9,36 ± 0,27
32	0	0,1	7,07 ± 0,40
8	2000	0,03	9,91 ± 0,45
12	2000	0,03	8,92 ± 0,16
24	2000	0,03	8,24 ± 0,28
32	2000	0,03	6,43 ± 0,21
8	2000	0	8,99 ± 0,58
12	2000	0	8,20 ± 0,16
24	2000	0	7,47 ± 0,30
32	2000	0	7,12 ± 0,54
8	2000	0,1	8,25 ± 0,28
12	2000	0,1	7,99 ± 0,15
24	2000	0,1	7,41 ± 0,53
32	2000	0,1	6,44 ± 0,37

Anexo 3. Dureza del grano de maíz en función del tiempo de maceración, concentración de SO_2 y dosis de hemicelulasa

Tiempo de maceración, h	SO_2, ppm	Hemicelulasa, g de enzima/kg de maíz	Dureza, gf
8	1000	0,03	10,44 ± 0,36
12	1000	0,03	8,94 ± 0,19
24	1000	0,03	7,81 ± 0,46
32	1000	0,03	7,53 ± 0,45
8	1000	0	10,95 ± 0,21
12	1000	0	10,50 ± 0,29
24	1000	0	10,15 ± 0,20
32	1000	0	8,61 ± 0,28
8	1000	0,1	10,40 ± 0,79
12	1000	0,1	9,15 ± 0,35
24	1000	0,1	8,33 ± 0,16
32	1000	0,1	7,21 ± 0,38
8	0	0,03	10,58 ± 0,47
12	0	0,03	9,06 ± 0,26
24	0	0,03	8,91 ± 0,11
32	0	0,03	7,41 ± 0,40
8	0	0	11,88 ± 0,35
12	0	0	11,05 ± 0,23
24	0	0	10,10 ± 0,67
32	0	0	9,24 ± 0,26
8	0	0,1	10,06 ± 0,34
12	0	0,1	9,12 ± 0,17
24	0	0,1	8,64 ± 0,34
32	0	0,1	7,09 ± 0,83
8	2000	0,03	9,30 ± 0,66
12	2000	0,03	7,85 ± 0,22
24	2000	0,03	6,57 ± 0,19
32	2000	0,03	5,91 ± 0,58
8	2000	0	8,99 ± 0,58
12	2000	0	8,20 ± 0,16
24	2000	0	7,47 ± 0,30
32	2000	0	7,12 ± 0,54
8	2000	0,1	7,77 ± 0,11
12	2000	0,1	7,36 ± 0,17
24	2000	0,1	6,89 ± 0,32
32	2000	0,1	6,36 ± 0,28