



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA Y TECNOLOGÍA
AVANZADA**

AREA ALIMENTOS

**ESTUDIO PARA LA OBTENCIÓN DE ALMIDÓN DE
MAÍZ POR MOLIENDA SECA Y EXTRACCIÓN DE LAS
PROTEÍNAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN TECNOLOGÍA AVANZADA**

PRESENTA:

ING. ORLANDO BELTRÁN GÓMEZ

México, D. F. 31 de Mayo, 2006.





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 11:00 horas del día 31 del mes de mayo del 2006 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis de grado titulada: **“Estudio para la obtención de almidón de maíz por molienda seca y extracción de las proteínas”**

Presentada por la alumno:

BELTRÁN
Apellido paterno

GÓMEZ
materno

ORLANDO
* nombre(s)

Con registro:

A	0	3	0	9	0	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRIA EN TECNOLOGIA AVANZADA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Director de tesis			
	Dr. Eduardo San Martín Martínez		Dr. Alfredo Cruz Orea
	Dr. José Luis Fernández Muñoz		Dr. Miguel Ángel Aguilar Frutis
	Dr. Ramón Arana Errasquin		M. en C. Mónica Rosalía Jaime Fonseca
El Presidente del Colegio			
Dr. José Antonio Irán Díaz			



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México Distrito Federal el día 08 del mes de Junio del año 2006, el (la) que suscribe Orlando Beltrán Gómez alumno (a) del Programa de Postgrado en Tecnología Avanzada con número de registro A030900, adscrito a CICATA – LEGARIA (IPN), manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Eduardo San Martín Martínez y cede los derechos del trabajo titulado Estudio para la obtención de almidón de maíz por molienda seca y extracción de las proteínas, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección orlanbego@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Orlando Beltrán Gómez

Nombre y firma

DEDICATORIA

A mi esposa Erika por el inmenso amor, apoyo y comprensión que siempre me ha brindado, siendo para mí la base y motivación para poder terminar esta etapa de mi formación profesional.

A mis padres Alfredo y Tomy, por el ejemplo de amor y superación que siempre me han brindado.

A mi familia: Miguel, Mónica y Monse; Toño, Sofía, Alfredo y Joselyn; Miguel, Alfredo y Tomy. Por su apoyo y comprensión.

A todos Ustedes con mucho amor.

AGRADECIMIENTOS

Al CICATA – IPN, por la oportunidad de superación profesional que me brindo.

Al Dr. Eduardo San Martín Martínez por sus conocimientos, principios, apoyo y confianza incondicional que me brindo en todo momento.

A los Doctores José Luís Fernández Muñoz, Alfredo Cruz Orea, Miguel Ángel Aguilar Frutis y Ramón Arana Arrasquen; por su atención, consejos y orientación importantes en la culminación de este trabajo.

Al M. en C. Miguel Aguilar Méndez, por su amistad y apoyo incondicional.

A la M. en C. Mónica Rosalía Jaime Fonseca, por su atención en todo momento.

Al Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora; Dr. Antonio Calderón y Srita. Leticia Cardona; por su atención y apoyo durante mis estancia en el CICATA - IPN.

A mis compañeros de laboratorio: Miguel L., Ignacio, Genaro, Miguel G., Cristina y Maru. Por su apoyo y muy agradable compañía.

A la Srita. Rocío y el Sr. Gerardo, por la ayuda y atenciones prestadas en la biblioteca.

A todas aquellas personas del CICATA que con sus buenos deseos me alentaron a culminar esta etapa importante en mi vida.

A todos Ustedes mis sinceros agradecimientos, Orlando.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Estructura del grano de maíz.....	2
2.2 Composición química de las partes del grano de maíz.....	5
2.3 El almidón de los cereales.....	7
2.4 Importancia del almidón.....	8
2.5 Producción de almidón.....	9
2.6 Composición química del almidón de maíz.....	9
2.7 Proteínas del grano de maíz.....	12
2.8 Nomenclatura para las proteínas del grano de maíz.....	12
2.9 Proteínas del endospermo.....	13
2.10 Extracción de las proteínas del maíz.....	13
2.11 Proceso de descascarado y desgerminado.....	14
2.12 Molienda a presión.....	16
2.13 Molino de bolas.....	19
2.14 Extracción del almidón.....	20
2.14.1 Molienda húmeda.....	24
2.14.2 Molienda seca.....	24
2.15 Almidón dañado.....	25
III. JUSTIFICACIÓN.....	29
IV. OBJETIVOS.....	29
a). Objetivo General.....	32

b). Objetivos Específicos.....	33
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
5.1 Materiales.....	33
5.2 Equipo.....	34
5.3 Métodos.....	34
5.3.1 Análisis proximal.....	34
5.3.2 Métodos experimentales.....	35
5.3.2.2 Descascarado del grano de maíz.....	35
5.3.2.2.1 Acondicionamiento.....	36
5.3.2.2.2 Descascarado.....	37
5.3.2.3 Separación de pericarpio, germen y endospermo.....	37
5.3.2.4 Molienda.....	37
5.3.2.5 Molino de bolas.....	40
5.3.2.6 Extracción de las proteínas.....	40
5.3.3 Caracterización del almidón obtenido.....	40
5.3.3.1 ÍSA e IAA.....	41
5.3.3.2 Viscosidad.....	43
5.3.3.3 Almidón Dañado.....	43
5.3.4 Diseño de experimentos y análisis estadísticos.....	44
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	45
6.1 Análisis proximal.....	45
6.2 Separación de los componentes del maíz.....	46
6.2.1 Separación del endospermo de maíz.....	46
6.2.2 Separación del pericarpio de maíz.....	46
6.2.3 Fracciones de endospermo y pericarpio de maíz.....	47
6.3 Contenido de fibra cruda.....	49
6.4 Molienda del endospermo en molino de bolas.....	51
6.3.1 Porcentaje de retención en malla 60.....	52
6.3.2 Porcentaje de retención en malla 80.....	53
6.3.3 Porcentaje de retención en malla 100.....	54
6.3.4 Porcentaje de retención en malla 200.....	56

6.3.5 Porcentaje de retención en el Fondo.....	58
6.5 Determinación de almidón dañado.....	60
6.6 Extracción de las proteínas.....	62
6.7 Caracterización del almidón.....	64
6.7.1 Determinación de Viscosidad.....	67
6.7.2 Almidón Dañado.....	69
6.7.3 Determinación de ISA e IAA.....	69
VII. CONCLUSIONES.....	70
VIII. RECOMENDACIONES.....	71
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	72
X. ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	Página
Cuadro 1. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%).	5
Cuadro 2. Variables y niveles de proceso para la separación de fracciones del grano de maíz.	39
Cuadro 3. Diseño experimental para la separación de fracciones del grano de maíz.	39
Cuadro 4. Variables y niveles de proceso para la molienda del almidón de maíz.	40
Cuadro 5. Diseño experimental para la molienda del almidón de maíz.	41
Cuadro 6. Composición proximal del almidón de maíz obtenido por molienda seca.	46
Cuadro 7. Separación de los componentes del maíz.	46
Cuadro 8. Contenido de fibra cruda del endospermo obtenido por el método de descascarado.	52
Cuadro 9. Contenido de fibra cruda del endospermo obtenido por el método de descascarado.	53
Cuadro 10. Porcentaje de almidón dañado en las muestras tratadas en el molino de bolas.	64

Cuadro 11. Extracción de proteínas del almidón de maíz por métodos diferentes.....	67
Cuadro 12. Porcentaje de almidón dañado.....	70
Cuadro 13. Valores de ISA e IAA de las muestras estudiadas.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Página
Figura 1. Corte longitudinal y transversal del grano de maíz.....	2
Figura 2. Mazorca de maíz dentado.....	3
Figura 3. Amilosa.....	10
Figura 4. Conformación helicoidal de la α – amilosa.....	11
Figura 5. Representaciones de la Amilopectina.....	11
Figura 6. Molienda a presión y clasificación con aire.....	22
Figura 7. Molienda a presión y clasificación con aire.....	22
Figura 8. Matriz protéica de harina de trigo suave.....	23
Figura 9. Variaciones morfológicas de la harina de trigo suave.....	23
Figura 10. Secador por aspersion para la producción de almidón.....	27
Figura 11. Diagrama de flujo de la obtención de almidón por molienda húmeda.....	28
Figura 12. Diagrama de flujo de la obtención de almidón por molienda seca.....	36
Figura 13. Descascarador continuo marca CICATA – IPN.....	38

Figura 14. Separación del Endospermo de maíz: a) Superficie de respuesta, b) Contorno.....	48
Figura 15. Separación de Pericarpio, Germen y Puntas del grano de maíz. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.....	50
Figura 16. Fracciones del grano de maíz: (a) Endospermo, (b) PGP y (c) Endospermo molido.....	52
Figura 17. Retención 60 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.	55
Figura 18. Retención 80 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.	57
Figura 19. Retención 100 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.....	59
Figura 20. Retención 200 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.....	61
Figura 21. Retención Fondo. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno....	63
Figura 22. Almidón dañado en el proceso de molienda en el molino de bolas.....	65
Figura 23. Diagrama de flujo de la extracción de proteínas del almidón de maíz.....	68
Figura 24. Viscoamilograma de la muestra de almidón producido y almidón comercial.....	70

RESUMEN

En la presente investigación se realizó la obtención de almidón por molienda seca y la extracción de las proteínas por ultrasonido y agentes reductores. La metodología empleada fue la adecuada, logrando producir un almidón con un contenido residual de proteínas del 0.16%. En la etapa de fraccionamiento de las partes del grano de maíz, el acondicionamiento del grano se realizó a 40°C durante 20 minutos, logrando en estas condiciones una separación del endospermo adecuada y un contenido de fibra mínimo de 0.0518%. La disminución del tamaño de partícula del endospermo se realizó con un molino de martillos y un molino de bolas, sin embargo, el segundo causó daños al almidón del orden de 35%. El porcentaje de almidón dañado obtenido por el molino de martillos fue de 10.02%. La extracción de las proteínas se realizó con solución salina (0.5M NaCl), etanol 70%, acetato de sodio, 2-Mercaptoetanol (2-ME) como agente reductor y ultrasonido. El almidón después de la etapa de extracción de proteínas fue secado a 30°C durante 6 horas. Las pruebas para caracterizar el almidón fueron: viscosidad, índice de solubilidad en agua (ISA), índice de absorción en agua (IAA) y almidón dañado. La viscosidad máxima fue de 2766 cP y la mínima de 1570 cP. El viscoamilograma presentó un descenso en la viscosidad después de alcanzar el valor máximo (a temperatura constante de 90°C), atribuyendo este comportamiento al almidón dañado presente en la muestra. El IAA para el almidón producido fue de 2.58 (g agua/g muestra) y de 1.98 (g agua/g muestra) para el testigo, indicando que el primero tiene mayor capacidad de absorber agua, posiblemente por el daño presente en su estructura. Los valores de ISA fueron de 0.22% y 0.31% (almidón producido y testigo, respectivamente), el tamaño de partícula puede ser un factor importante que favorece la solubilidad de los almidones en agua. El proceso propuesto en este estudio mostró ser viable para la producción de almidón con bajo contenido de proteína residual.

ABSTRACT

In the present investigation was studied the starch obtaining by dry milling and the extraction of proteins by ultrasound and reducing agents. The used methodology was the adequate, managing to produce a starch with protein residual content of 0.16%. In the stage of separation of the parts of the corn grain, the preparation of the grain was made to 40°C during 20 minutes, obtaining in these conditions a separation of endosperm adequate and a minimum content of 0.0518% fiber. The particle diminution of endosperm was made with a mill of hammers and a mill of balls; nevertheless, the second caused damages to the starch of the order of 35%. The percentage of damaged starch obtained by the dry milling was of 10.02%. The extraction of proteins was made with saline solution (0.5M NaCl), ethanol 70%, sodium acetate, 2-Mercaptoetanol (2-ME) as reducing agent and ultrasound. The starch after the stage of protein extraction was dried to 30°C during 6 hours. The analyses made to starch compared with a commercial starch, were: viscosity (VIS), water solubility index (WSI), water absorption index (WAI) and damaged starch (DS). The results showed that maxima VIS was 2766 cP and the 1570 minim. Viscoamilograma presented a reduction in viscosity after reaching the maximum value (to constant temperature of 90°C), attributing this behavior to starch damaged present in the sample. The WAI for the produced starch was of 2.58 (g water/g sample) and of 1.98 (g water/g sample) for the sample commercial, indicating that first it has greater capacity to absorb water, possibly by present damage in their structure. The values of WSI were of 0.22% and the 0.31% (produced starch and sample commercial, respectively); size of particle can be an important factor that favors the solubility of water starches. The process proposed in this study showed to be viable for the starch production with low residual protein content.

I. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías establecidas en los grandes procesos industriales están en continua revisión en cuanto a su factibilidad técnica y económica y ante los retos que demanda ahora la sociedad, es decir, las tecnologías tienen que ser limpias y no generadoras de desechos contaminantes y bajos en consumos de energía. Los volúmenes usados de agua para la obtención de almidón por vía húmeda son de 1.5 – 2 m³/t de maíz procesado. Mayores volúmenes de agua son requeridos en el proceso final y la tendencia hacia productos de almidón modificados requiere de mayor consumo de agua.

Las operaciones por molienda húmeda requieren altos consumos de energía 1.48 millones de kilocalorías por tonelada de maíz. Cerca del 20% de la energía requerida total es para la electricidad, lo cual indica que la mayor parte de la energía es de combustible para generar vapor. Si los productos tienden a ser más sofisticados requerirían mayor consumo de energía. Estas condiciones hacen que una industria de extracción de almidón por molienda húmeda solo sea factible a través de la producción en gran escala es así que pequeñas industrias no serían rentables.

Por los antecedentes revisados se observa que las investigaciones recientes están en la búsqueda de tecnologías alternativas al proceso de obtención de almidón por molienda húmeda y las tecnologías tendrán que ser más factibles que el proceso anterior en cuanto al consumo de energía y agua manteniendo el almidón con el menor daño posible por los procesos propuestos. Así, en esta investigación se está proponiendo una tecnología alternativa de obtención de almidón por molienda seca y separación de proteínas por proceso de sonoquímica y agentes reductores, obteniéndose por este proceso los siguientes productos: pericarpio, germen y puntas por un lado, por otro se separa del almidón las proteínas obteniéndose también estos dos productos.

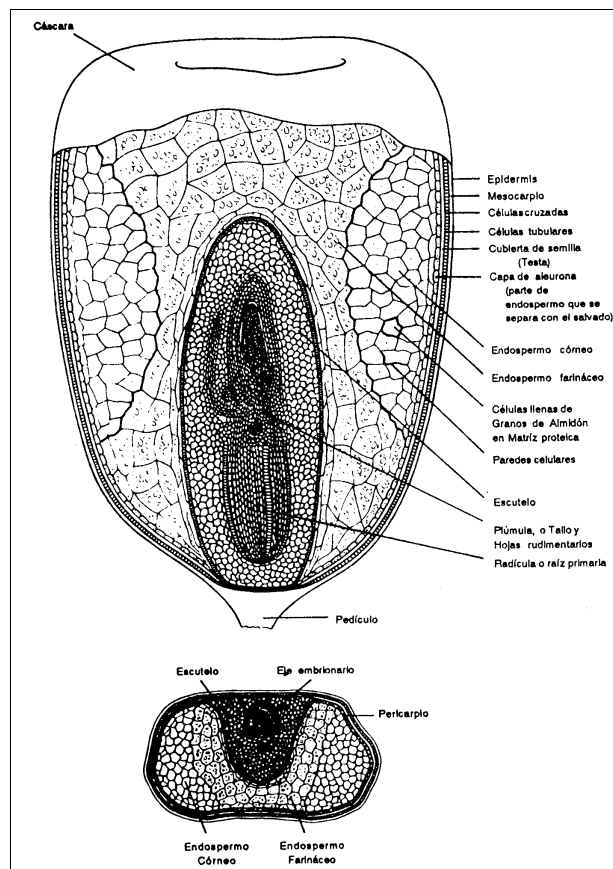
II. ANTECEDENTES

Para conocer los procesos de separación de almidón es necesario saber de que componentes esta estructurado el maíz y que propiedades posee cada uno de estos componentes

2.1 Estructura del grano de Maíz

Los miembros de la familia de las “Gramíneas” que producen granos de cereal, generan frutos. Este tipo de frutos están cubiertos en una carióspside que vulgarmente se denomina grano. La carióspside o pericarpio rodea a la semilla y se adhiere fuertemente a la cubierta, en el cereal ya maduro tiene la función de impedir el ingreso de hongos y bacterias. La semilla esta constituida a su vez por embrión o germen y endospermo encerrados dentro de una epidermis y de la cubierta de la semilla (Hoseney, 1991).

Figura 1. Cortes longitudinal y transversal de un grano de maíz.



En el mundo se cultivan muchos tipos de maíz. El maíz dentado tiene las semillas grandes y aplastadas. Es, con mucho, la mayor de las semillas de los cereales corrientes con un peso medio de 350mg. El grano esta compuesto por cuatro partes principales: cáscara o salvado (pericarpio y cubierta de la semilla), germen, endospermo y pedicelo. El pedicelo, la parte con la que se aplica al zurco, puede que se separe o no, del grano durante el desgrane. El grano del maíz es de color muy variable; puede ser de color uniforme o variegado y abarca desde el blanco al pardo oscuro o púrpura. Los colores más corrientes son: el blanco y el amarillo. El salvado constituye el 5-6% del grano; el germen es relativamente grande: un 10-14% del grano y el resto corresponde al endospermo. Dentro del mismo grano de maíz, se encuentra endospermo translucido y opaco. El endospermo translúcido, es muy compacto, sin espacios aéreos como era de esperar. Los granos de almidón, de forma poliédrica, se mantienen unidos unos a los otros a través de una matriz proteica. En una micrografía son muy visibles los cuerpos proteicos; estos se han identificado como cuerpos de zeína (Hoseney, 1991).

Figura 2. Mazorca de maíz dentado.



El endospermo constituye el 82 – 84% del peso del grano seco y esta compuesto por 86 – 89% de almidón. Estando estructurado en su mayor parte por paquetes de células elongadas con gránulos de almidón redondos ó poliédricos de 3 – 2,5µm de diámetro. Dentro del grano maduro, cada gránulo esta embebido en una matriz proteica compuesta de una fase de proteína continua carente de estructura en la cual son implantados los gránulos de almidón (White, 2003).

También son notorias las depresiones producidas por los cuerpos proteicos en el almidón: En el endospermo opaco, los granos de almidón son esféricos y la matriz proteica que los recubre está exenta de cuerpos proteicos. Gran cantidad de espacios aéreos son de esperar la causa de la opacidad. El análisis químico, por separado, de los endospermos opaco y translucido, demostró que ambos contenían igual cantidad de proteína, pero que los tipos de esta, no eran iguales (Hoseney, 1991).

El endospermo opaco del maíz suele ser llamado endospermo blando, y el tamaño de partículas obtenidas en la molturación de la mutante de maíz con todo el endospermo opaco, también indica un endospermo blando. Los granos de almidón de la parte opaca y translúcida del endospermo, tienen forma diferente. Una posible explicación del hecho de que en un mismo grano se encuentren dos tipos de almidón es que durante el proceso de desecación natural, la proteína pierde agua y se encoge. La adherencia entre la proteína y el almidón es suficientemente fuerte para apretar los granos más y más los unos contra los otros. En esta etapa, los granos de almidón son flexibles y, como son comprimidos fuertemente, adquieren forma poliédrica. Una evidencia más de su flexibilidad se basa en las marcas dejadas en los granos de almidón del endospermo translucido por los cuerpos de zeína. En el endospermo opaco, la distribución de la proteína y la composición de los aminoácidos, son muy diferentes. Durante la desecación, se rompen los enlaces proteína - proteína formándose espacios aéreos intergranulares y granos de almidón esféricos. Si se recolecta el maíz antes de que estar seco, los granos de almidón son esféricos (Hoseney, 1991).

2.2 Composición química de las partes del grano de maíz

Las partes principales del grano de maíz difieren considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%). El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón (87%), aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo. Por último, el germen se caracteriza por un elevado contenido de grasas crudas, el 33 % por término medio, y contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (aproximadamente 20%) y minerales. (Burge and Duensing, 1989).

Cuadro 1. Composición química proximal de las partes principales de los granos de maíz (%).

Componente Químico	Pericarpio	Endospermo	Germen
Proteínas	3.7	8	18.4
Extracto etéreo	1	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcar	0.34	0.62	10.8

Fuente: Watson, 1987.

El aceite de germen suministra niveles relativamente elevados de ácidos grasos (Bressani et al. 1958; Weber, 1987); cuando se dan ingestas elevadas de maíz, como sucede en determinadas poblaciones, quienes consumen el grano desgerminado obtendrán menos ácidos grasos que quienes comen el maíz entero elaborado. Esa diferencia tiene probablemente igual importancia en lo que se refiere a las proteínas, dado que el contenido de aminoácidos de las proteínas del germen difiere radicalmente de las proteínas del endospermo.

Así pues, si se analiza todo el grano, el contenido de aminoácidos esenciales refleja el contenido de aminoácidos de las proteínas del endospermo, pese a que la configuración de éstos en el caso del germen es más elevada y mejor equilibrada. No obstante, las proteínas del germen proporcionan una cantidad relativamente alta de determinados aminoácidos, aunque no suficiente para elevar la calidad de las proteínas de todo el grano. El germen aporta pequeñas cantidades de lisina y triptofano, los dos aminoácidos esenciales limitantes en las proteínas del maíz. Las proteínas del endospermo tienen un bajo contenido de lisina y triptofano, al igual que las proteínas de todo el grano. La deficiencia de lisina, triptofano e isoleucina ha sido perfectamente demostrada mediante numerosos estudios con animales (Howe, Jason y Gilfillan, 1965) y un número reducido de estudios con seres humanos (Bressani, 1971).

Los hidratos de carbono (principalmente almidón), después las proteínas, grasas y la fibra dietética, es el componente químico del maíz que se halla en cantidades mayores. Los hidratos de carbono complejos del grano de maíz se encuentran en el pericarpio y la piloriza, aunque también en las paredes celulares del endospermo y en menor medida en las del germen (Sandstead, et al. 1978; Van Soest, Fadel and Sniffed, 1979). Hallaron que el salvado de maíz está formado por un 75 por ciento de hemicelulosa, un 25 por ciento de celulosa y 0.1 por ciento de lignina, en peso en seco. El contenido de fibra dietética de los granos descascarados será evidentemente menor que el de los granos enteros.

El grano maduro contiene pequeñas cantidades de otros hidratos de carbono, además de almidón. El total de azúcares del grano varía entre el 1 y 3 por ciento y la sacarosa, el elemento más importante, se halla esencialmente en el germen. En los granos en vías de maduración hay niveles más elevados de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos. Doce días después de la polinización, el contenido de azúcares es relativamente elevado, mientras que el almidón es bajo. Conforme madura el grano, disminuyen los azúcares y aumenta el almidón (White, 2003).

Así, por ejemplo, se ha determinado que, en granos de 16 días de vida, los azúcares alcanzan un nivel del 9.4 por ciento del peso en seco del grano, pero que su nivel disminuye considerablemente con el paso del tiempo. La concentración de sacarosa a los 15 – 18 días de la polinización asciende a una cantidad situada entre el 4 y 8 por ciento del peso seco del grano. A estos niveles relativamente elevados de azúcares y sacarosa se debe posiblemente el hecho de que el maíz común todavía está verde y en mayor medida, a la variedad de maíz dulce que son tan apreciados por la gente (White, 2003).

2.3 El almidón de los cereales

Los almidones de cereal contienen bajos niveles de grasas. Los lípidos asociados con almidón son generalmente lípidos polares los cuales requieren de solventes polares para su extracción. El nivel de lípidos es entre 0.5 a 1%. Los almidones de fuentes diferentes no contienen lípidos. Los almidones contienen fósforo y nitrógeno y minerales en bajos niveles. El almidón está compuesto esencialmente por glucosa. Contiene un número de constituyentes menores que aparecen en bajos niveles. Siempre que estos compuestos se encuentran en el almidón, pueden interferir con sus propiedades (Hoseney, 1991). Las propiedades del almidón provienen del comportamiento único que tiene este componente en medio acuoso (Doublier, 1999).

El almidón básicamente es un polímero de α -glucosa. Químicamente, por lo menos hay dos tipos distinguibles: amilosa que es esencialmente un polímero lineal, y amilopectina, que es altamente ramificada (Doublier, 1999; Hoseney, 1991).

Los cereales almacenan energía en el grano en forma de almidón. La cantidad de almidón contenido en el grano de cereal, varía, pero generalmente oscila entre el 60 y 75% del peso del grano. Por esto, gran parte del alimento consumido por los humanos, está en forma de almidón; una fuente excelente de energía. Además de su valor nutritivo, el almidón es importante a causa de su efecto sobre las propiedades físicas de muchos de nuestros alimentos. Por ejemplo: la gelificación del pudín, el

espesamiento de salsas y el fraguado de algunos postres, está todo ello fuertemente influenciado por las propiedades del almidón. El almidón también es un producto industrial importante, particularmente en la industria papelera (Thomas and Atwel, 1999).

Cuando el almidón es dispersado en agua fría, éste experimenta un hinchamiento limitado ya que la absorción de agua es pequeña (aproximadamente 30%), pero con suficiente calor, los sistemas alimenticios que contienen almidón experimentan cambios dramáticos que están relacionados con la gelatinización y la formación de pastas. Estos cambios ocurren alrededor de la temperatura de gelatinización (60°C en sistemas con exceso de agua), sin embargo esta temperatura puede cambiar en función de los solutos disueltos, el contenido de agua, etc., y de las características del medio, la fuente de donde proviene el almidón, el tamaño y forma del gránulo, rigidez y deformabilidad del gránulo (Doublier, 1999).

2.4 Importancia del almidón

El almidón es considerado como el 2° compuesto más abundante en la naturaleza, Según Vega y Bontux (1998) se producen al año 1000 millones de toneladas de almidón en forma de productos agrícolas de estas el 50% se destina para alimentación humana o animal y el restante sufre transformaciones industriales. Los almidones tienen una amplia aplicación en los alimentos siendo su funcionalidad dividida en 6 grandes grupos: Agente espesante, estabilizador coloidal, retención de humedad, agente para la formación de geles, agente de cobertura y para revestimiento y garapiñado de alimentos.

Actualmente la comunidad científica está en la búsqueda de modificaciones físicas del almidón encontrando en los nuevos almidones modificados una familia de almidones llamada como "naturales funcionales" la cual ofrece amplias ventajas ya que son resistentes a la temperatura, tolerancia a la acción mecánica y al pH así como estabilidad en condiciones de almacenamiento en frío, aportan al alimento una

textura suave y además no producen sensación pastosa. También presentan un perfil aromatizante que permite saborear y diferenciar los sabores de los alimentos terminados. Estos almidones se pueden utilizar en los productos lácteos, sopas, condimentos, jugos, salsas, alimentos infantiles y preparados de frutas (Vega and Bontoux, 1977).

En adición a su valor energético los almidones nativos así como los modificados pueden ser usados para cambiar las propiedades físicas de muchos alimentos por ejemplo: los almidones comerciales obtenidos de los cereales maíz y trigo así como los de raíces y tubérculos como papa, camote y yuca pueden ser usados como agentes gelificantes, espesantes, adhesivos, retención de humedad, estabilizantes y texturizantes. Además el almidón también es un producto industrial importante particularmente en la industria del papel y la textil (Thomas y Atwell 1999).

2.5 Producción de almidón

Según Vega y Bontoux en 1998 la producción mundial de almidón fue del orden de 1×10^9 toneladas de estas el 50% se destinó para alimentación Humana o animal y el restante 50% para transformaciones industriales. Sin embargo un reporte del "International Starch Institute, 1998" estima que la producción mundial de almidón es del orden de 4 a 5×10^9 toneladas, siendo los principales productores por regiones Norte América con 1.5×10^9 , la Unión Europea (7.8×10^8), Japón (2.5×10^8) y otros países (9×10^8) toneladas. Las cuatro fuentes principales de extracción de almidón son el maíz, el trigo, la patata y la yuca siendo el maíz la principal fuente de extracción de almidón y el país donde más se produce son los Estados Unidos de Norte América.

2.6 Composición química del almidón de maíz

El componente químico principal del grano de maíz es el almidón, al que corresponde hasta el 72-73 por ciento del peso del grano. Otros hidratos de carbono

son azúcares sencillos en forma de glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades que varían del 1 al 3 por ciento del grano. El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula esencialmente lineal de unidades de glucosa, que constituye hasta el 25-30 por ciento del almidón, teniendo algunas ramificaciones. El polímero amilopectina también consiste de unidades de glucosa, pero en forma ramificada y constituye hasta el 70-75 por ciento del almidón. La composición del almidón viene determinada genéticamente. En el maíz común, ya sea con un endospermo de tipo dentado o córneo, el contenido de amilosa y amilopectina del almidón es tal como se ha descrito anteriormente, pero el gen que produce maíz ceroso contiene un almidón formado totalmente por amilopectina. Un mutante del endospermo, denominado diluyente de la amilosa (da), hace aumentar la proporción de amilosa del almidón hasta el 50 por ciento y más. Otros genes, solos o combinados, pueden modificar la composición del almidón al alterar la proporción entre la amilosa y la amilopectina (Boyer y Shannon, 1983).

El almidón está compuesto fundamentalmente por glucosa. Aunque puede contener una serie de constituyentes en cantidades mínimas, estos aparecen a niveles tan bajos, que es discutible si son oligoconstituyentes del almidón, o contaminantes no eliminados completamente en el proceso de extracción. Incluso, aunque estos constituyentes mínimos se encuentren en pequeñas cantidades en el almidón, puede afectar y de hecho afectan a las propiedades del almidón (Hoseney, 1991).

La amilosa es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos $\alpha(1,4)$, que establece largas cadenas lineales con 200 – 2500 unidades y pesos moleculares hasta de un millón; es decir, la amilosa es una α -D-(1,4)-glucana, cuya unidad repetitiva es la α -maltosa, también varios autores tienen demostrados que la amilosa tiene ramificaciones $\alpha(1,6)$. Tiene la facilidad de adquirir una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa, (Hoseney, 1991).

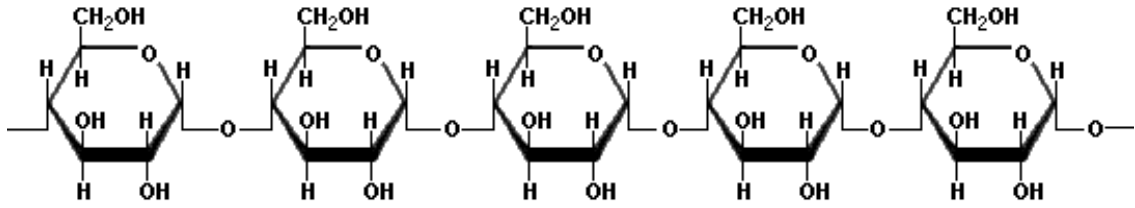


Figura 3. Amilosa.

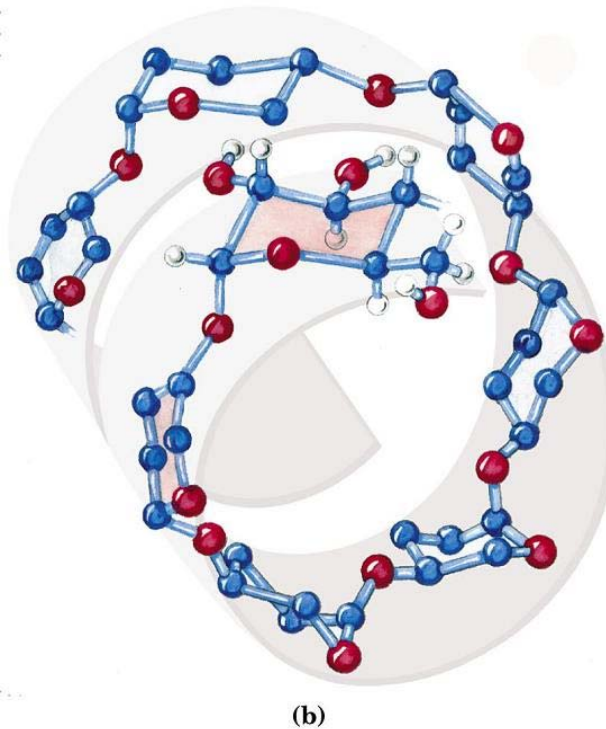


Figura 4. Conformación helicoidal de la α – amilosa.

Por su parte la amilopectina se diferencia de la amilosa en que contienen ramificaciones que le dan una forma molecular similar a la de un árbol; las ramas están unidas al tronco central (semejante a la amilosa) por enlaces α -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa. Su peso molecular es muy alto ya que algunas fracciones llegan a alcanzar hasta 200 millones de daltones (Hoseney, 1991).

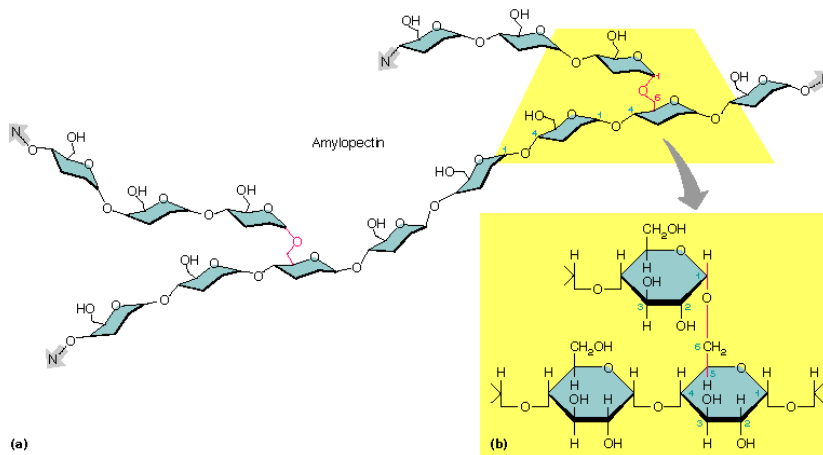


Figura 5. Representaciones de la Amilopectina.

Según Thomas y Atwell (1999) tanto los pesos moleculares como el grado de polimerización difieren grandemente para la amilosa y amilopectina. Para la amilosa el grado de polimerización es entre 1500 a 6000 mientras que para la amilopectina es de 300,000 a 3, 000,000 en la base de ese grado de polimerización y dado el peso molecular de la glucosa de 162, los pesos moleculares de la amilosa esta en el orden de 243,000 a 972,000 y de la amilopectina es aproximadamente de 10, 000,000 a 500, 000,000.

La amilosa y la amilopectina no existen libres en la naturaleza pero son componentes de discretos agregados semicristalinos llamados gránulos de almidón. El tamaño, la forma y la estructura de esos gránulos varían dependiendo de la fuente botánica siendo los diámetros de los gránulos entre 1 a 100 micras y las formas pueden ser regulares o irregulares. El trigo, la cebada y el centeno contienen gránulos de dos diferentes tamaños y de distinta forma una de ellas es del tipo “A” en donde los gránulos son del orden de 35 μm de diámetro y de forma oval, el otro grupo de gránulos son mas pequeños y del tipo “B” esféricos y de alrededor de 3 μm de diámetro (White, 2003).

2.7 Proteína del grano de maíz

El contenido de proteína del grano de maíz puede variar generalmente dependiendo del tipo, variedad, condiciones agronómicas y otros factores. El contenido de proteína del grano de maíz puede variar de 6 – 18%. Desde 1907, el contenido de proteína del maíz comercial ha variado solamente de 9 a 12% (Earle, 1977). El contenido de proteína en el grano según Lasztity, (1996) es mayor en el germen (17 – 20%) y menor en el salvado (4 – 6%). El endospermo contiene 8 –9% de proteína. Por el tamaño del endospermo, este contiene cerca del 75% del total de las proteínas del grano. El contenido de proteínas del endospermo disminuye de la región externa hacia el centro del grano (Hinton, 1953).

Tradicionalmente, las proteínas del cereal pueden ser clasificadas dentro de cuatro tipos de acuerdo a su solubilidad. Esta clasificación de las proteínas de los cereales fue aportada por T. B. Osborne en inicios del siglo 20 (1924). La clasificación de Osborne es la siguiente: albúminas solubles en agua pura; globulinas solubles en diluciones salinas pero insolubles en agua pura; prolaminas solubles en etanol al 70% y glutelinas – proteínas, solubles en diluciones ácidas o básicas. Sin embargo, otros procedimientos para clasificar también son usados y consideran aspectos morfológicos, función biológica o composición química (White, 2003).

Las albúminas y globulinas constituyen la mayoría de las proteínas con actividad fisiológica. Estas proteínas están concentradas en las células de aleurona, salvado y germen, con baja concentración en el endospermo. Las prolaminas y glutelinas son las proteínas de almacenamiento en el maíz. Estas proteínas son usadas durante la germinación y son encontradas mayormente en el endospermo. Ellas no se encuentran en el salvado o germen. El endospermo contienen aproximadamente 5% de albúminas y globulinas, 44% prolaminas, 28% glutelinas y cerca del 17% de proteínas no extraídas por el procedimiento de Osborne (Hoseney 1994).

2.8 Nomenclatura para las proteínas de maíz

White (2003) menciona que hasta la década de 1960 la nomenclatura de las proteínas del maíz fue basada en los criterios de solubilidad de Osborne. Si eran solubles en agua, estas eran albúminas; si eran solubles en sales, estas eran globulinas; si eran solubles en soluciones de alcohol, estas eran prolaminas (zeínas); y si eran solubles en ácidos diluidos o bases, estas eran glutelinas. Esta nomenclatura cambió con los trabajos de Landry and Moureaux (1970) and Paulis and Wall (1971). Porque la solubilización completa de las proteínas no fue posible usando el procedimiento de Osborne; ambos investigadores descubrieron que la proteína adicional podría ser extraída usando un agente reductor 2 Mercapto Etanol (2 – ME).

Para despejar un poco la confusión en distinguir las proteínas solubles en alcohol, dos nomenclaturas fueron propuestas: La primera, por Wilson (1985, 1987), fue basada en la solubilidad en alcohol acuoso y el desplazamiento en sodio dodecil sulfato – poliacrilamida gel electroforesis (SDS-PAGE). La segunda nomenclatura, fue propuesta por Esen (1987) y es esta la nomenclatura más usada hoy en día. La nomenclatura de Esen esta basada en la solubilidad de la proteína en 2 – propanol después de la reducción con 2 ME y desplazamiento en SDS – PAGE para identificación.

2.9 Proteínas del endospermo

Representa un 10% y es biológicamente balanceada. La zeína que es la principal proteína del endospermo es muy deficiente en lisina (2%), y triptofano (0.5%). Para el crecimiento y mantención de tejidos del cuerpo humano, estos niveles deben duplicarse a 4 y a 1% respectivamente (White, 2003). Diversos estudios muestran que los depósitos de proteína en el endospermo, en los cuales esta la mayoría de las proteínas, son localizados exclusivamente dentro de cuerpos subcelulares conocidos simplemente como cuerpos de proteína (Duvick, 1961). Los estudios de Christianson

et al (1969), permiten conocer ahora que los cuerpos de proteína contienen las cuatro zeínas identificadas por SDS – PAGE.

Los cuerpos de proteína en el endospermo normal y algunos mutantes de almidón varían de 1.5 – 1.8 μ m (Wolf et al, 1969). Los cuerpos de proteína están empaquetados y apretando los gránulos de almidón en el endospermo. Estos autores comentan sobre la ocurrencia de la matriz proteica, la cual rodea los cuerpos de proteína y los gránulos de almidón.

Albúminas y Globulinas. Las albúminas son definidas como proteínas solubles en agua; el procedimiento original de Osborne separa albúminas de globulinas considerando que, después de la extracción con soluciones salinas, las albúminas remanentes son solubles en agua y las globulinas precipitan. Problemas con la solubilidad de albúminas y globulinas fueron revisados por Paulis and Wall (1971, 1981).

Prolaminas. Las prolaminas (zeínas) son la principal proteína de almacenamiento en el maíz. La zeína constituye entre 44 y 79% de la proteína del endospermo, dependiendo de la variedad de maíz y el método de separación usado (Larkins, 1981; Hosenev, 1994; Hamaker et al, 1995; Landry et al, 2000). Las zeínas pueden ser separadas por diferentes solubilidades y su estructura se relaciona en cuatro tipos: α , β , γ , y δ (Esen 1987, 1990).

La α - zeína es la más abundante prolamina del maíz, se encuentra en un 70% del total (Thompson and Larkins, 1989). Esta puede ser extraída con alcohol acuoso sin usar un agente reductor. Las prolaminas extraídas utilizando en método de Osborne son en su mayoría α - zeínas, estas son llamadas comúnmente “zeínas nativas”.

La β -zeína, esta se encuentra cerca del 5% del total de la zeína (Thompson and Larkins, 1989). La β -zeína, llamada en la vieja literatura zeína nativa, es soluble en 60% etanol acuoso sin agente reductor.

Las γ -zeinas es el segundo grupo más abundante de las prolaminas de maíz (Wilson et al, 1981; Vitale et al, 1982), constituyen cerca del 20% del total de las zeinas (Thompson and Larkins, 1989). Las γ -zeinas son altas en cisteína y, por lo tanto, son solubles solamente en presencia de un agente reductor. La γ -zeína no es conocida por la clasificación de Osborne dadas a las prolaminas. Las γ -zeinas para ser solubles en alcohol ellas necesitan tener una reducción con 2-ME ó algún otro agente reductor. Sin embargo, en la primera reducción, γ -zeína son solubles en agua.

Las δ -zeinas. Después de disolver en 60% de 2 propanol, conteniendo 1% ME; exhibe características similares a las mostradas por α -zeinas. Las δ -zeinas son aproximadamente 5% del total de las zeinas del endospermo (Thompson and Larkins, 1989).

Glutelinas. El método más usado en el fraccionamiento de las glutelinas es el LM (Landry - Moureaux, 1970; Landry et al, 2000). Este método usa 2-ME para fraccionar a las glutelinas. Las fracciones G_1 y G_2 contienen polipéptidos que son clasificados ahora en su mayor parte como zeinas. La G_3 ó glutelina insoluble en alcohol (Paulis, and Wall, 1971), es la falsa fracción de glutelina en el endospermo porque esta fracción no contiene proteínas encontradas en los cuerpos de proteína y contiene la proteína que construye la matriz.

Las propiedades de los lazos de la matriz de proteína juntos son liberados por tratamientos con álcalis o agentes reductores, tales como 2-ME y el sulfito para la molienda húmeda (Paulis, and Wall, 1971). Estos tratamientos liberan el almidón y los cuerpos de proteínas y muchas de las proteínas de la matriz son recuperados en la fracción de harina de gluten de maíz en la molienda humedades grano.

2.10 Extracción de las proteínas del maíz

Desde la publicación de la clasificación de Osborne basada en la solubilidad, el procedimiento ha sido usado para el fraccionamiento de las proteínas del grano. Los

datos publicados en la literatura varían mucho, esas diferencias encontradas pueden atribuirse a las dificultades encontradas en la extracción de las proteínas del grano de maíz. Las variaciones en los porcentajes aparentes de las diferentes fracciones pueden ser usadas por ligeras alteraciones en los procedimientos usados para la extracción, Por las grandes dificultades para solubilizar las proteínas del maíz, debido a que el procedimiento de Osborne no extrae todas las proteínas, extensas investigaciones se han realizado intentando encontrar procedimientos de extracción alternativos durante los últimos 70 años (White 2003).

La actividad superficial de las moléculas fue mostrada por Nagy (1941) para eficientizar los solventes en las proteínas de maíz. La gran actividad superficial de las moléculas trabaja favorablemente pero solubiliza solamente entre el 62 y 70% de las proteínas. El método también fue complicado debido a que todos los tipos de proteína son solubilizados en la primera extracción, haciendo difícil la separación en fracciones. En algunos trabajos, Nagy y colaboradores (1941) encontraron que adiciones 0.5% de acetato de sodio durante la extracción por alcohol según el método de Osborne, incremento las prolaminas extraídas en un 17%.

Otros procedimientos de extracción, los cuales aprovechan el total de las proteínas extraídas del endospermo en el maíz (95 – 98%) fueron reportados por Mertz and Bressani (1957). El llamado método toma lugar en un medio alcalino (pH 12) que contiene sulfato de cobre pentahidratado y sulfito de sodio. Cuando se compara con la fraccionación de Osborne, en el método de Mertz and Bressani (Mertz et al, 1958) aparentemente se sobreestimaron las globulinas y albúminas y se disminuyeron las glutelinas. También se debe de considerar que el método de Mertz and Bressani causa cambios en la proteína nativa de maíz (Mertz et al, 1958; Paulis et al, 1969).

Landry and Moureaux (1970), en cierto modo, mejoraron la extracción de las proteínas de maíz. El procedimiento y los extractos de agua, sal y alcohol – soluble usados en el proyecto de fraccionamiento de proteínas de Osborne. El Método de Landry and Moureaux difieren de Osborne en que las glutelinas fueron extraídas

usando un agente reductor, 2 – mercaptoetanol (2 – ME). Las glutelinas fueron extraídas secuencialmente con 2 – ME, agua y alcohol (G_1), 2 – ME y solución buffer alcalina (G_2) y 2 – ME y dodecil sulfato de sodio (SDS) (G_3). Este sistema tiene dos avances: Primero, este fue exhaustivo, extrayendo el restante 5% del total de las proteínas; segundo, este fue una extensión del fraccionamiento clásico de Osborne.

Según White (2003), un método modificado de Osborne - Mendel se utilizó para separar las proteínas de una muestra de endospermo de maíz en cinco fracciones (albúminas, globulinas, zeínas, glutelinas reducidas solubles en alcohol y glutelinas reducidas insolubles en alcohol). Las albúminas y globulinas fueron aisladas de 10g de harina desgrasada con 0.5M de NaCl de acuerdo al procedimiento descrito por Paulis y Wall (1969). Los residuos de harina después de la extracción con 0.5M de NaCl fueron lavados con agua hasta quedar libres de sal. Las Zeínas fueron extraídas por un movimiento vigoroso con 100ml de etanol 70% conteniendo 0.5% de acetato de sodio a temperatura ambiente por 1 hora, con tres repetidas extracciones. Después de cada extracción, la suspensión fue centrifugada a temperatura ambiente a 1000g por 10 minutos. Para obtener las glutelinas reducidas solubles en alcohol (ASG), El residuo fue extraído después con 100ml de etanol 70% y 0.5% de Acetato de sodio conteniendo 0.1M β -mercaptoetanol por 0.5hr, con dos repeticiones. Los residuos remanentes fueron lavados con alcohol 70%. El material final contiene principalmente almidón y glutelinas insolubles en alcohol. Las glutelinas insolubles en alcohol según Paulis, (1975) fueron extraídas con un buffer (0.125M Tris-borato, 0.1% SDS (pH 8.9) y 1% β -mercaptoetanol).

El método original de extracción LM, fue laborioso y consume tiempo, requiriendo 16 extracciones cerca de 8.5 hr. Recientemente, Landry et al (2000) simplifican su procedimiento. Métodos similares que usan agentes reductores en alcohol para fraccionar glutelina fueron reportados por Sodek and Wilson (1971) y Paulis and Wall (1971). Sodek and Wilson (1971) complementan su fraccionamiento por extracción con 0.2% de hidróxido de sodio. La extracción por el método de Sodek and Wilson solubiliza cerca del 85% del total de la proteína del endospermo. Similar al

procedimiento de LM, el método de Paulis et al (1975) complementa el fraccionamiento con extracción en bufer de tris–borato conteniendo SDS y 1% 2–ME. Este método solubiliza cerca del 98% de las proteínas de endospermo. Esen (1986) reporto un método para separar prolaminas en tres fracciones basadas en la diferencia de solubilidades en 2–propanol.

Un nuevo método para extraer la zeína del maíz fue reportado por Wallace y colaboradores (1990). El nuevo método fue demostrado posteriormente para hacerlo rápido y detallado, extrayendo 95% de el total de proteínas por Hamaker et al, (1995).

Estudios realizados por Dickey et al. 1998; encontraron que cuando las partículas de maíz obtenidos por molienda seca fueron sometidas a una extracción de las proteínas de los aglomerados de almidón - proteína con alcohol al 70% en un vaso de agitación, teniendo una relación de masa de 4:1 (alcohol al 70% para una de maíz) por un periodo de 1-6hr a temperatura ambiente. La solución del extracto fue filtrada y centrifugada para remover partículas suspendidas después de la extracción y luego diluidas a 40% de etanol para precipitar extractos solubles. Medidas de las partículas de masa suspendidas separadas por centrifugación indican que la mezcla de partículas de maíz con el etanol disuelve y debilita la proteína entre las celdas y entre los gránulos de almidón próximas a la superficie de las partículas. Bajo las condiciones de este estudio partículas de maíz liberan gránulos de almidón más rápidamente que la disolución de cuerpos proteicos, como el indicado por el análisis de las partículas centrifugadas. Análisis de la extracción a temperatura ambiente de la proteína indica, que a un tamaño de partícula de 2mm presenta más masa convectiva transferida que a 20 μ m.

2.11 Proceso de descascarado y desgerminado

El grano de maíz presenta una serie de problemas para su fraccionamiento. Es grande, duro, plano y, además, contiene un germen mayor que el de los otros

cereales (12% del grano). El germen es rico en grasa (34%) y ha de ser eliminado si se quiere almacenar sin que se ponga rancio, o comience el proceso de auto oxidación de los lípidos. En la molturación tradicional de maíz con piedras, no se elimina el germen y el producto, que por lo general no se envía muy lejos, se enrancia con frecuencia. En la molturación del maíz, los productos deseados son sémolas bajas en grasas, que harina de maíz. Por esta razón, el fabricante desea eliminar la cáscara (es decir: pericarpio, cubiertas de la semilla, capas de aleurona) y germen, sin reducir el endospermo. El modo más efectivo es con un desgerminador, un molino especializado de frotamiento que se compone básicamente de dos superficies cónicas que giran una dentro de la otra; frotan el maíz hasta separar la cáscara y dejar suelto el germen. Antes de desgerminar el maíz, se suele atemperar hasta un grado alto de humedad (21%) (Hoseney, 1991).

Los procesos de descascaramiento y desgerminado necesitan una etapa de reposo para la molienda húmeda y seca esto con el objeto de ablandar el pericarpio y el germen y así facilitar la remoción durante la desgerminación. El pericarpio es separado del endospermo y el germen por aspiración (Mistry and Eckhoff, 1992). Sin embargo algunos pericarpios y endospermos se mantienen adheridos al germen separado. Esfuerzos para mantener limpio el endospermo y germen resultan en germen roto y endospermo reducido a grits y esto decrece el aceite recuperado. Varios pretratamientos o pasos de acondicionamientos han sido desarrollados para el maíz mejorando la separación del endospermo sin cambiar el aceite recuperado del germen (Brekke 1965, 1966, 1967, 1968). Primeros pretratamientos realizados incluyen el tratamiento alcalino antes de la desgerminación para mejorar la efectividad del remojo (Warner 1942, Hensen 1949). El tratamiento alcalino fue desarrollado para descascarar maíz y utilizar el maíz libre de cáscara para nuevos procesos. La ventaja del proceso alcalino es que proporciona mayor contenido de aceite, mas grits y reducción en el número de aspiraciones y molienda en el molino de rodillos, por lo tanto menor costo total. Weinecke (1962) trabajo el maíz con 0.1% de hidróxido de sodio mejorando la separación del germen y endospermo.

2.12 Molienda a presión

La molienda a presión es una técnica que utiliza energía de fluido para moler por impacto. Empleada para la reducción ultrafina de materiales. La eficiencia de la molienda a presión combinada con la clasificación de aire es muy adecuada para separar almidón de otros componentes agregados a la harina de trigo y para producir almidón de trigo con bajo contenido de proteína residual (Letang, C. 2001).

Estos estudios previos son necesarios para la separación de los componentes del grano de maíz y así obtener un endospermo limpio o libre de germen y pericarpio. Con el endospermo limpio se realiza la separación del almidón de la matriz proteica en la que sé esta embebida, para ello un proceso de separación fue estudiado para otros cereales como el trigo. Las Harinas deben ser molidas para aumentar la separación del almidón y proteínas dando fracciones finas y intermedias de harinas. Los molinos de pernos son comúnmente usados para estos propósitos (Bonnet 1984, Piat 1984). El molino de pernos usa un disco fijo y otro rotatorio, o dos discos de pernos girando con relación a un intermedio. Las Harinas son molidas por el impacto de las partículas contra los pinos. La velocidad de impacto puede alcanzar una velocidad periférica arriba de 150m/seg. Harina puede también ser molida por fricción y las harinas molidas por este método tienen un menor contenido de daño de los gránulos de almidón comparados con los producidos por los molinos de pernos (Nwakowski et al 1986).

Según Helle, 1988. La molienda por flujo a alta presión es otra opción interesante para la reducción de todos los agregados de las harinas, produciendo polvos superfinos. Las partículas son aceleradas en aire a alta velocidad impactando contra superficies sólidas ó colisionando contra otras partículas en dirección opuesta, reduciendo el tamaño de las partículas. Se tienen dos tipos generales de molienda jet. Una es la molienda jet espiral en la cual las partículas son proyectadas a alta velocidad por aire comprimido contra otras en flujo contrario y contra las paredes de la cámara de molienda. La pendiente de la boquilla provoca una corriente de aire en

espiral produciendo una separación dinámica. Las partículas grandes se mantienen en la periferia bajo el efecto de la fuerza centrífuga y son otra vez molidas, donde las partículas finas son separadas por la parte superior. El otro es un molino yet opuesto con boquillas localizadas en una periferia de la cámara de molienda y proyectan en dirección opuestas. La molienda es acompañada solamente por la colisión entre partículas. Este dispositivo logra grandes velocidades de impacto entre las partículas. Este tipo de molienda jet es asociado con un clasificador dinámico de jaula de ardilla que retira el polvo de una determinada granulometría para fuera del molino. Molino jet es muy efectivo para reducir partículas a tamaño ultra fino. La velocidad de flujo a la salida de la boquilla puede exceder Mach 1.

La eficiencia del molino yet combinado con la clasificación de aire es muy eficiente para separar almidón de otros componentes agregados a la harina de trigo y para producir almidón de trigo con muy bajo contenido residual de proteínas, el índice residual de proteínas en el almidón después de varias pasadas por el molino es menor que 2% bs (Letang et al, 2001).

Figura 6. Molienda a presión y clasificación con aire (Letang et al., 2001).

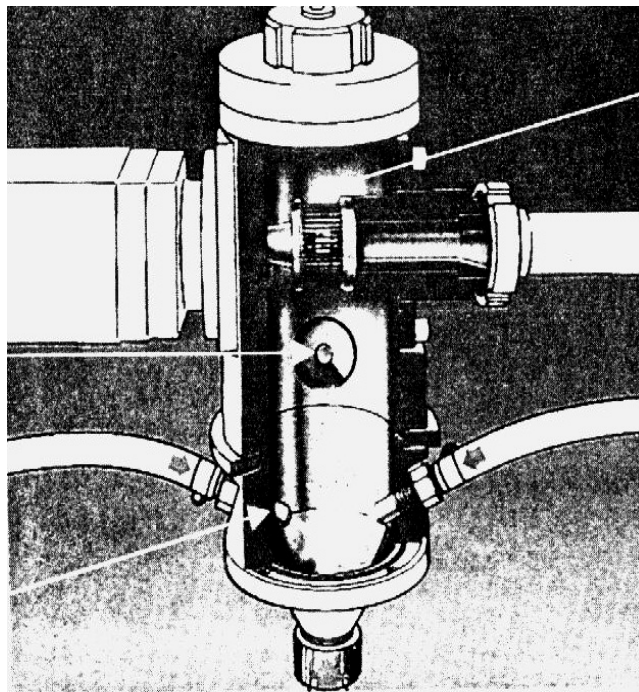


Figura 7. Molienda a presión y clasificación con aire (Letang et al, 2001).

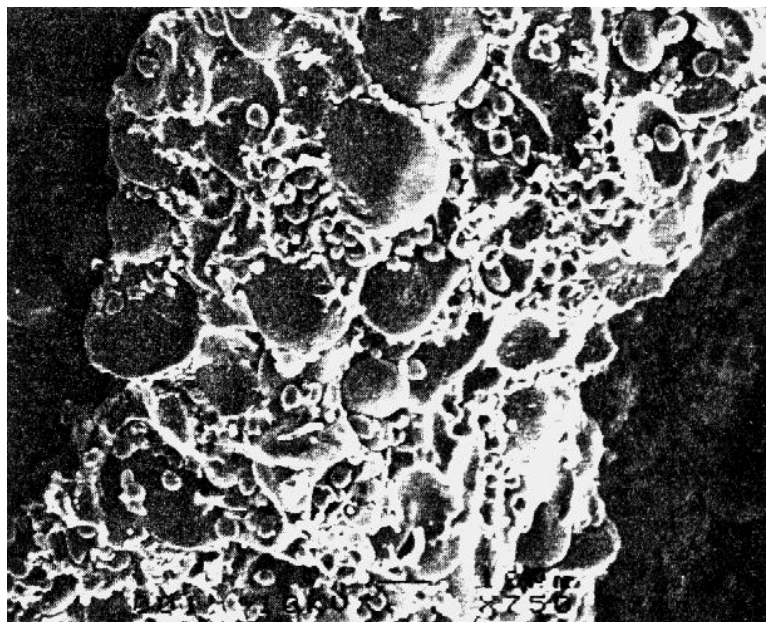
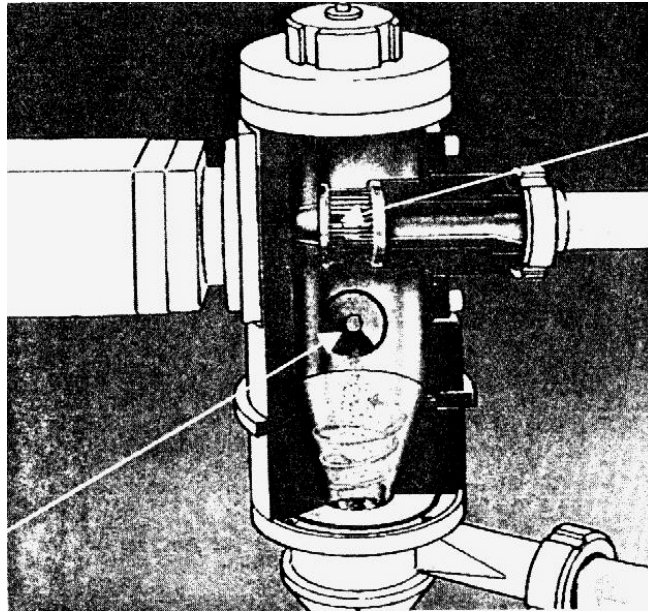


Figura 8. Matriz protéica de harina de trigo suave (Letang, C. 2001).

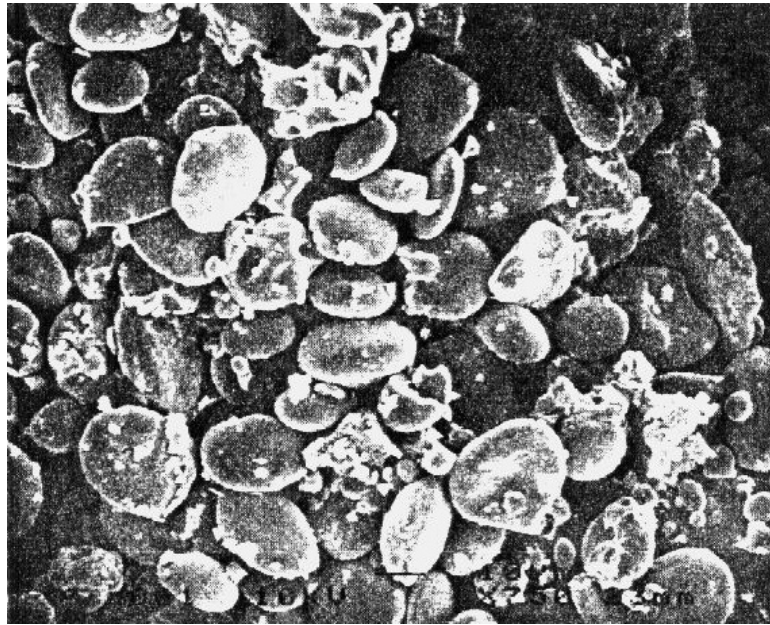


Figura 9. Variaciones morfológicas de la harina de trigo suave (Letang et al, 2001).

2.13 Molino de Bolas

El almidón de trigo y maíz fue molido por bolas para obtener varios niveles de almidón dañado, el cual fue bien digerido con α -amilasa de hongos. La porción de almidón sin daño comprende los gránulos de almidón nativos que sobreviven (N) y los remanentes de birrefringencia de gránulos grandes que han sido parcialmente dañados (R). La microscopia electrónica de barrido para las muestras mas dañadas muestra que el material N esta compuesto por gránulos medios y grandes, mientras que el material R fue cualquiera de las células vacías de gránulos medianos y grandes ó pequeños fragmentos irregulares. El análisis del tamaño de partícula confirma que gránulos pequeños en almidón de trigo fueron más probables para ser completamente dañados que los gránulos grandes (Tester, 1994).

Según Tester (1994), los almidones molidos por bolas no son encontrados en sistemas alimenticios y se supone que la fuerza de los tipos de daños causados a estos es diferente para los daños causados por molinos de rodillos y otras formas físicas de procesamiento que no involucran calor. Hubo evidentemente similitudes entre los remanentes aislados para los dos tipos de almidón dañado. El molino de bolas para los almidones provee un sistema válido para estudiar las propiedades generales de almidones dañados y para construir un modelo de estructura del granulo de almidón.

Los almidones de maíz y trigo fueron molidos por bolas para obtener varios niveles de almidón dañado, con correspondientes pérdidas de cortos rangos en su orden de cristalinidad y el contenido de su doble hélice. La entalpía y la temperatura de gelatinización de los almidones (para el gránulo nativo recuperado mas el remanente) disminuyen cuando incrementan los niveles de almidón dañado (Morrison, 1994).

2.14 Extracción del almidón

Los surfactantes pueden ser usados en la purificación del almidón. Paulis (1981), reporto que el benceno dodecyl sulfatado (DBS) generalmente disminuye la proteína residual en almidón, generando complejos proteína - DBS. Fujii and Tomiyana (1973) estudiaron el efecto de sodio α -olefinas sulfatadas (0.1 – 0.5%) sobre las proteínas removibles del almidón de papa. Después de 1 hora de agitación, el contenido de proteína residual de almidón disminuyo a 0.08%, una reducción del 50% en el contenido de proteína residual comparado con 29% reducido cuando se utiliza agua.

El ultrasonido a altas intensidades fue evaluado como un método alternativo para aislar el almidón de arroz sin el uso de químicos como en el método tradicional de remojo alcalino. Los surfactantes (SDS, SSL y Tween 80; a 0.1, 0.3 y 0.5%) combinados con una alta intensidad de ultrasonido fueron también investigados para el aislamiento de almidón de arroz. La harina de arroz fue sometida a sonificación por

15, 30 y 60 minutos con amplitudes de 25, 50 y 75% a 40 ó 50°C. El almidón producido no fue afectado significativamente por el tratamiento de temperatura después del tratamiento de sonicación; el contenido de proteína y almidón dañado después de la aislamiento del almidón fue de 0.9 – 1.7% y 3.3 – 3.5% (en base seca), respectivamente. La combinación de 0.5% de SDS y alta intensidad de ultrasonido mejoran el almidón producido a 84.9% con bajo contenido de proteína residual, sin embargo, poco mejoramiento fue observado con SSL o Tween 80 (Wang, 2004).

2.14.1 Molienda Húmeda

El proceso de molienda húmeda es utilizado para separar eficientemente las partes del grano de maíz y purificar sus constituyentes (almidón, aceite, proteína y fibra), haciéndolos aceptables para ser usados como ingredientes en alimentos y para usos industriales (Anderson and Watson, 1982).

Según White (2003), la tecnología utilizada en la refinación del almidón se puede resumir de la siguiente forma: La primera etapa en la molienda húmeda involucra un remojo del grano en agua y dióxido de azufre (SO₂) bajo condiciones cuidadosamente controladas para ablandar la textura del grano. El grano blando es pulverizado y sus componentes son separados por cribado, centrifugado, hidrociclones y lavado para producir germen rico en aceite. Típicamente la industria produce 67.5% almidón, 7.5% germen, 5.0% gluten, 11.5% fibra y 7.6% sólidos solubles en agua.

Las etapas de la purificación del almidón se pueden describir un poco más de la siguiente forma (White, 2003):

- a) Limpieza. El maíz es limpiado para remover la materia extraña. La limpieza se realiza para evitar problemas durante el proceso, tales como restricción del flujo de agua durante el proceso, incremento en la viscosidad del líquido,

incremento en el deterioro del equipo y problemas de calidad en el almidón final.

- b) Remojo. El maíz limpio pasa por una primera etapa crítica en la molienda húmeda que es el remojo, en el cual el maíz es sumergido en agua bajo condiciones controladas de temperatura, tiempo, concentración de dióxido de azufre (SO₂) y recirculación de agua. Esas condiciones son necesarias para promover la difusión del agua a través de la capa externa del grano hacia el germen, endospermo y sus componentes celulares. Remojando incrementa el contenido de humedad del grano a cerca del 45%, el tamaño del grano aumenta casi al doble de su peso seco facilitando la separación de los componentes del grano. La concentración del 0.12 – 0.2% de SO₂ es importante por dos razones: primero, SO₂ es un agente reductor, el cual rompe los enlaces bisulfuro en la matriz proteica que envuelve el granulo de almidón y segundo, SO₂ funciona como agente antimicrobiano de bacterias *Lactobacillus*, la cual produce acido láctico que fermenta azucares disueltos dentro del agua. El almidón es mantenido en remojo a temperatura de 52°C durante 22 – 50hr. Para mantener la temperatura de remojo se recircula el H₂O caliente.

- c) Separación de los componentes del grano. Los componentes del grano de maíz son separados en dos etapas que involucran primero una trituration y después una separación del germen por hidrociclones. El molino utilizado para la separación es de discos. La separación del germen se da cuando se presentan los sólidos disueltos en el hidrociclón y por diferencia de densidades del germen sale quedando únicamente la mezcla de almidón y agua.

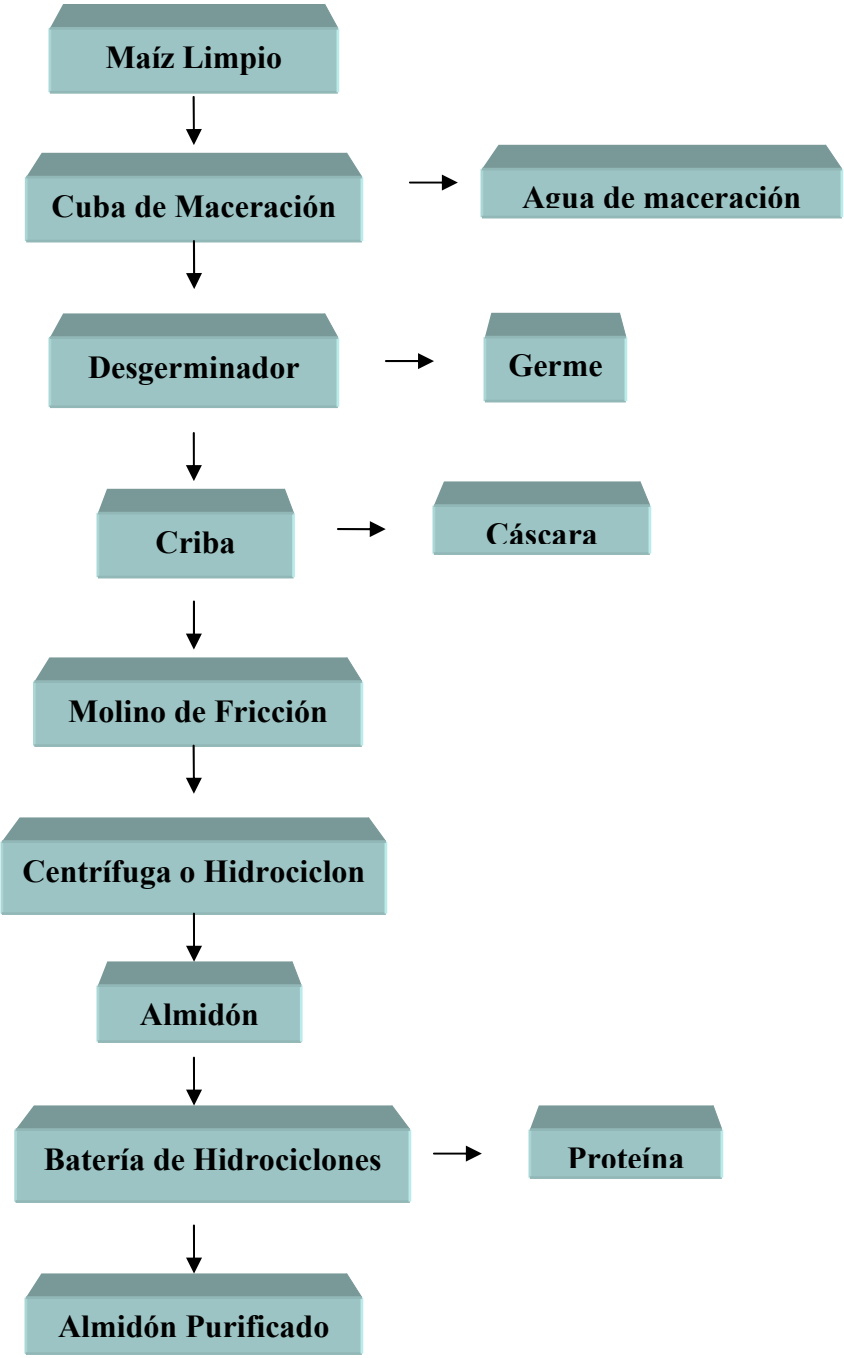
- d) Separación primaria del almidón. Con el germen y la fibra separada las proteínas son separadas por centrifugas e hidrociclones.

- e) Purificación. El almidón de la centrifuga primaria contiene 3 – 5% de proteína y pequeñas porciones de otras impurezas solubles e insolubles. El almidón crudo es lavado con agua en contracorriente usando hidrociclones con un diámetro de 10mm. El lavado del almidón muestra un contenido menor a 0.30% de proteína total y 0.01% de proteína soluble. El agua usada para el lavado del almidón es generalmente desionizada. El agua es calentada a 38 – 43°C para alcanzar a remover materia soluble.
- f) Purificación del almidón. El almidón relativamente puro es agitado, la molienda húmeda por la que paso contiene cerca del 40% de sólidos. Este puede ser secado directamente o tratado con algún químico para modificar las propiedades del almidón. Los residuos de químicos son lavados en centrifugas usando 1 – 2m³ de agua por tonelada de almidón.

Figura 10. Secador por aspersión para la producción de almidón.



Figura 11. Diagrama de flujo de la obtención de almidón por molienda húmeda.



2.14.2 Molienda Seca

La molienda es un arte antiguo, cuya principal función es hacer que los cereales resulten más agradables y más deseados como alimentos. La molienda seca generalmente implica la eliminación de lo que el molinero llama salvado, es decir; el pericarpio, la cubierta de la semilla, epidermis y la capa de aleurona. Además generalmente se elimina el germen por ser relativamente rico en aceite, lo que hace que el producto se enrancie rápidamente disminuyendo su calidad. El salvado y germen son relativamente ricos en proteínas, vitaminas B, sustancias minerales y grasas, de modo que el producto molido si bien gana en paladar, pierde en valor nutritivo (White, 2003).

2.15 Almidón dañado

Los gránulos de almidón dañado se hidratan rápidamente y son susceptibles a la hidrólisis enzimática (Ranhotra et. al; 1993). Un cierto nivel de almidón dañado es deseable por que esto optimiza la hidratación y promueve la fermentación durante la panificación. Sin embargo, un exceso en almidón dañado puede hidratar demasiado la pasta y permitir la aceleración de la actividad enzimática (Ranhotra, et. al; 1993).

Los métodos usados comúnmente para la determinación de almidón dañado se basan en ensayos enzimáticos y yodo métricos (Lin and Guchajowska, 1996). Los métodos enzimáticos dependen del incremento en la susceptibilidad de los gránulos de almidón dañado al ataque de la α - amilasa. Los resultados producidos son medidos volumetricamente ó a través de espectrofotómetros. Los métodos yodométricos dependen sobre el incremento en la reactividad de gránulos dañados con yodo y la reacción es medida amperometricamente ó colorimetricamente (Morgan and Williams, 1995).

Según Boyaci, (2004) un método nuevo fue desarrollado para determinar el almidón dañado en la harina de trigo. El método se basa en la idea que la diferencia entre el

contenido de materia soluble de los extractos preparados para algunas harinas y aquellos sin alfa amilasa es principalmente debido a la acción de la alfa amilasa sobre los gránulos dañados. La base de la extracción de el método es similar al método de la AACC (76 – 30 A). Sin embargo, después de la aplicación del método oficial un refractómetro fue usado para medir °Brix de soluciones en lugar de determinar azúcares reductores. El tamaño de la muestra y el periodo de incubación del método de la AACC fue optimizado por el método de superficie de respuesta. Por último, los niveles de almidón dañado obtenidos por este método son compararon con los métodos de la AACC (No: 76 – 30 A y 76 – 31), usando un análisis de regresión. Los coeficientes de correlación entre el método propuesto y ambos métodos de la AACC fueron de 0.99. El método propuesto puede realizarse en 30 minutos con un bajo número de pasos experimentales.

Boyaci, (2004) en su procedimiento de extracción uso 9 gramos como tamaño de muestra y el periodo de incubación fue de 30 minutos, obtenidos del estudio de la superficie de respuesta. Después de la extracción, los valores de °Brix del blanco y las muestras de soluciones fueron determinados y el almidón dañado fue calculado usando la ecuación:

$$\text{Almidón dañado (\%)} = \{((B_2 - B_1)V) / (M)\}F$$

Donde: B_1 = Valores de °Brix del blanco filtrado.

B_2 = Valores de °Brix de la muestra filtrada.

M = Tamaño de la muestra.

F = Factor de conversión.

Por los antecedentes revisados se observa que las investigaciones recientes están en la búsqueda de tecnologías alternativas al proceso de obtención de almidón por molienda húmeda y las tecnologías tendrán que ser más factibles que el proceso anterior en cuanto al consumo de energía y agua manteniendo el almidón con el menor daño posible por los procesos propuestos. Así en esta investigación se está

proponiendo una tecnología alternativa de obtención de almidón por molienda seca y separación de proteínas con solventes, obteniendo por este proceso los siguientes productos: pericarpio, germen y puntas por un lado para la extracción de aceites; por otro lado se separa el almidón de las proteínas obteniendo también estos dos productos.

III. JUSTIFICACIÓN

La producción de almidón actualmente es una actividad económica redituable para aquellos que tienen la capacidad y solvencia económica que les permita llevarla a cabo. La tendencia en el uso de este insumo alimenticio es el emplearlo en mayor proporción como parte de las formulas alimenticias considerando las propiedades funcionales que tiene este producto, uso que no se restringe al área de los alimentos y que se expande a diversas áreas productivas. Por ello el buscar alternativas viables para producir este insumo es sin duda una prioridad en la industria y una oportunidad de desarrollo en la investigación.

La producción de almidón por molienda seca y la extracción de las proteínas, es una alternativa que se plantea como una posible solución a las restricciones que tiene la tecnología actual de gasto de energía y agua, recursos importantes que conforme pasa el tiempo se deber de cuidar mucho mas. Además, del aporte que se le da al sector industrial sobresale de igual forma la posibilidad de brindar a pequeños productores o asociaciones puedan tomar esta tecnología como una alternativa para la producción de almidón, la cual no requiere economías de gran escala.

IV. OBJETIVOS

a). Objetivo General

- Estudio para la obtención de almidón de maíz por molienda seca y extracción de proteínas.

b). Objetivos Específicos

- Estudiar las variables de tiempo y temperatura en la separación del pericarpio, puntas y germen del endospermo del maíz.
- Estudiar el proceso de molienda seca para observar el efecto del tamaño de partículas en el proceso de separación de almidón y proteínas.
- Estudiar el efecto del ultrasonido y agentes reductores en la extracción de proteínas.
- Evaluar los métodos propuestos para la extracción de proteínas del almidón de maíz.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

- Para obtener el almidón se partió de maíz blanco dentado del estado de Guerrero – México.
- En la extracción de las proteínas se utilizó: Cloruro de Sodio, Soluciones de Etanol, Acetato de Sodio y 2-ME.
- Se utilizó almidón de maíz comercial marca MIVE (División Almidones), como control para los análisis realizados al producto final.

5.2 Equipo

- Balanza Analítica Marca OHAUS Precisión Advanced. Precisión $\pm 0.1g$. USA.
- Balanza Analítica Marca OHAUS Explorer Precisión $\pm 0.0001g$. USA.
- Centrífuga “International Centrifuge” size 2, model k de International Equipment Co. Motor 0.75 HP 50/60 Hz. USA.
- Descascarador diseñado en CICATA – IPN. México, patente en registro.
- Digestor y Destilador Microkjeldahl Marca Labconco USA.
- Equipo neumático adaptado para la separación de los componentes del maíz. CICATA – IPN.
- Estufa Eléctrica Marca J. M. Ortiz D6F774, 150°C, 110 Volts y 15 A.
- Limpiadora de granos y semillas, motor ASEA 0.5 HP, 3 fases tipo NMT–8–4, 50/60 Hz. México, México.
- Equipo de Ultrasónico. Cole – Parmer. Modelo 08890 – 11. Cole – Parmer Instrument Company Vernon Hills, Illinois 60061, USA.
- Medidor de pH Corning / ion meter 450. USA.
- Mufla Lindberg México. 220 Volts.

- Molino de laboratorio Raymond de 16 in con alimentador de acción manual y una capacidad de 1 Kg/h. Motor de 2 HP USA.
- Parrilla con agitación Barnstead - Thermolyne Nuova II Modelo No. SP18425, 120 Volts, 7.3 A, 60 Hz. USA.
- Secador de charolas F. J. Stockes Corp. PA USA.
- Viscosímetro RVA "Rapid Visco-Analyzer" modelo 4C (Newport Scientific PTY Ltd, Sydney, Australia).

5.3 Métodos

5.3.1 Análisis Proximal

El análisis proximal del almidón obtenido se realizó de acuerdo a los métodos oficiales reportados por la American Association of Cereal Chemists (AACC, 2000), descritos a continuación:

- *Humedad.* Se determinó de acuerdo al método oficial AACC 44-15A (2000), secado en estufa a 105°C a peso constante.
- *Proteína.* El nitrógeno total fue determinado por Micro Kjeldahl, método 46-13 de la AACC (2000), utilizando un factor de conversión N X 6.25 para proteína bruta.
- *Cenizas.* Se calcularon de acuerdo al método 08-17 de la AACC (2000). El cual indica el procedimiento para calcular cenizas en almidones.
- *Lípidos.* Según el método 30-10 de la AACC (2000). Realizando una extracción continua con solventes en el Soxhlet.
- *Carbohidratos.* Fueron obtenidos por diferencia.

5.3.2 Métodos experimentales

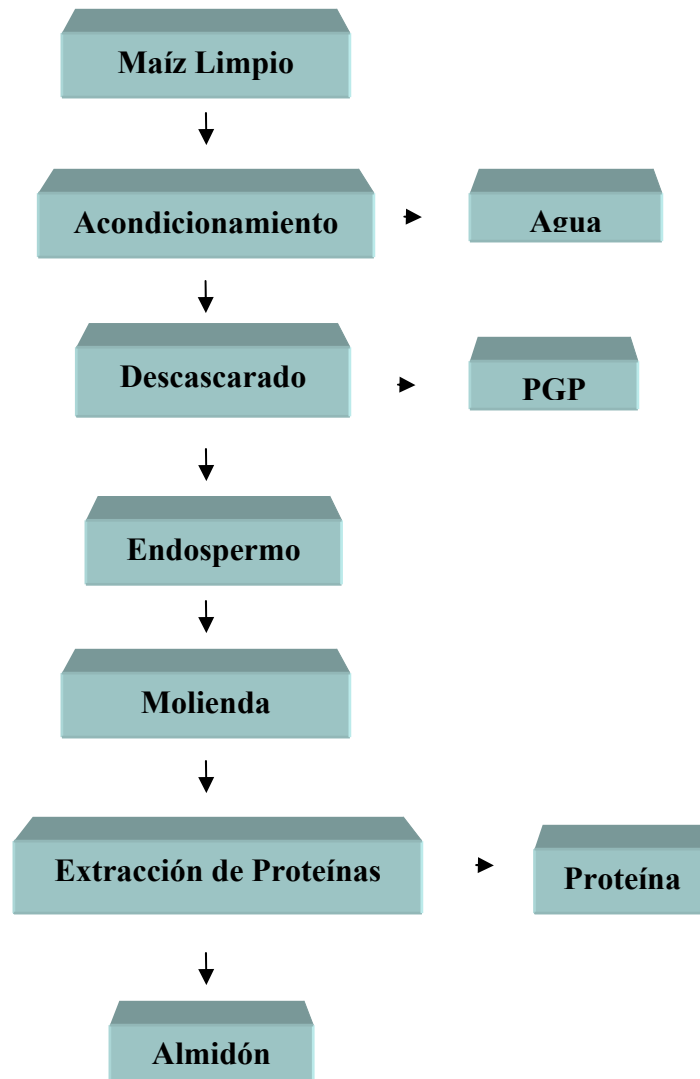


Figura 12. Diagrama de flujo de la obtención de almidón por molienda seca.

5.3.2.1 Limpieza del grano de maíz

El grano de maíz se pasó por una criba con una abertura promedio de 7.502mm para separarlo de tierra, granos quebrados y materia extraña.

5.3.2.2 Descascarado del grano de maíz

5.3.2.2.1 Acondicionamiento

La materia prima debe de tener un acondicionamiento con el objeto de promover la difusión del agua a través del grano, el acondicionamiento se realiza en condiciones controladas de tiempo y temperatura, con ello se logra suavizarlo y facilita la separación de sus componentes.

Para conocer las condiciones de temperatura y tiempo de acondicionamiento, que favorecen la separación de las fracciones del grano, el maíz entero limpio, fue macerado en agua, manteniendo una relación fija de una parte de maíz para 0.8 partes de agua a diferentes niveles de temperatura y tiempo de acondicionamiento con agitación intermitente y de acuerdo a las condiciones establecidas previamente por el diseño de experimentos (Cuadro 2).

Transcurrido el tiempo de acondicionamiento, el agua fue drenada y el grano se dejó escurrir durante 10 minutos para alimentarlo posteriormente al descascarador.

5.3.3.2.2 Descascarado

Se realizo en un equipo de flujo continuo diseñado en el CICATA – IPN (UNIDAD LEGARIA), manteniendo constante el tiempo de residencia (1

minuto y la velocidad de rotación a 800rpm). El maíz se alimenta directamente a la malla interna en donde se remueve el pericarpio de los demás componentes por la acción abrasiva de las paletas sobre la superficie del grano entero. El maíz entero que quedó sin descascarar sé retroalimenta nuevamente al equipo para otro tratamiento.

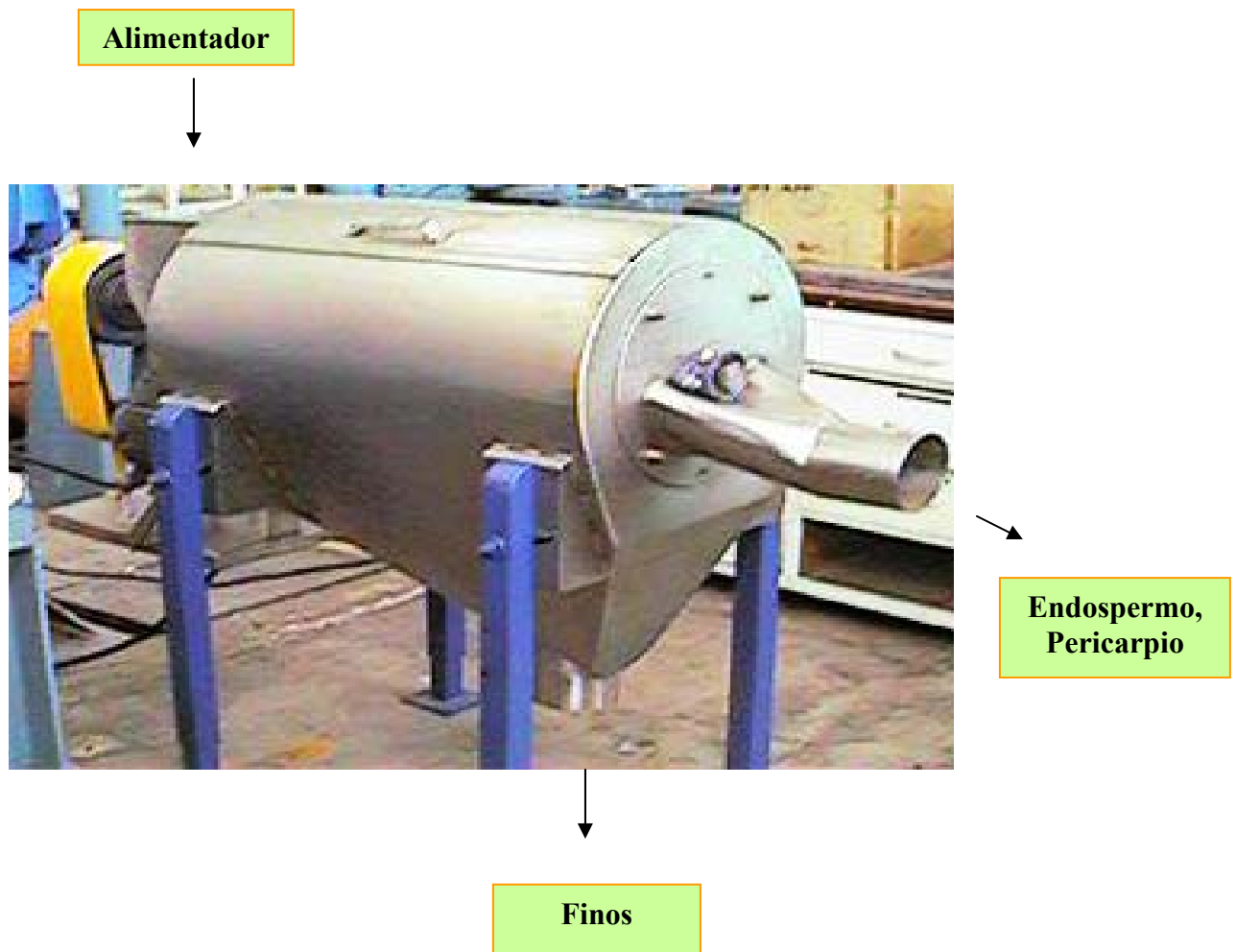


Figura 13. Descascarador continuo marca CICATA – IPN.

Cuadro 2. Variables y niveles de proceso para la separación de fracciones del grano de maíz.

Variables	Niveles				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X1 = Temperatura (°C)	22	25	32.5	40	43
X2 = tiempo (min.)	6	10	20	30	34

Cuadro 3. Diseño experimental para la separación de fracciones del grano de maíz.

Ensayo	Corrida	Variables Codificadas		Variables Experimentales	
		X1	X2	X1	X2
1	10	-1	-1	25	10
2	2	-1	1	25	30
3	1	1	-1	40	10
4	7	1	1	40	30
5	5	0	0	32.5	20
6	9	0	0	32.5	20
7	4	0	0	32.5	20
8	11	0	0	32.5	20
9	3	0	0	32.5	20
10	12	1.414	0	43	20
11	13	-1.414	0	22	20
12	6	0	1.414	32.5	34
13	8	0	-1.414	32.5	6

5.3.2.3 Separación del pericarpio, germen y endospermo

El maíz fraccionado o descascarado fue separado en un equipo neumático CICATA – IPN donde se obtuvo el pericarpio y puntas por un lado, endospermo y germen por el otro. Las fracciones obtenidas del grano se colocan en un secador de charolas para lograr un contenido de humedad adecuado para la molienda.

5.3.2.4 Molienda

La molienda se realizó en un molino de martillos de laboratorio Raymond de 16 in con alimentador de acción manual y una capacidad de 1 Kg/h. Motor de 2 HP USA.

5.3.2.5 Molino de bolas

Con el objeto de disminuir el tamaño de partícula y favorecer la extracción de las proteínas del endospermo obtenido en el proceso de descascarado, se utilizó el molino de bolas. Las variables estudiadas fueron: Humedad de la muestra y Tiempo de molienda (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variables y niveles de proceso para la molienda del almidón de maíz.

Variables	Niveles				
	-1.414	-1	0	1	1.414
X1 = Humedad (%)	5.17	6	8	10	10.83
X2 = Tiempo (h)	1.75	2	2.5	3	3.25

Cuadro 5. Diseño experimental para la molienda del almidón de maíz.

Ensayo	Corrida	Variables Codificadas		Variables Experimentales	
		X1	X2	X1	X2
1	5	-1	-1	6	2
2	11	-1	1	6	3
3	2	1	-1	10	2
4	8	1	1	10	3
5	7	0	0	8	2.5
6	3	0	0	8	2.5
7	6	0	0	8	2.5
8	10	0	0	8	2.5
9	1	0	0	8	2.5
10	4	1.414	0	11	2.5
11	12	-1.414	0	5	2.5
12	13	0	1.414	8	3.25
13	9	0	-1.414	8	1.75

5.3.2.6 Extracción de las proteínas

El método usado en el fraccionamiento de las proteínas del endospermo fue basado en las propuestas hechas por Osborne (1924) y la modificación al método de Osborne hecha por Landry – Moureaux (1970) y Landry et al. (2000); además de los estudios realizados por Wang, Y. J. (2004).

El método modificado de Osborne utiliza un agente reductor (2-ME) para fraccionar las proteínas que originalmente Osborne no logra extraer (glutelinas y parte de las prolaminas, logrando realizar una extracción exhaustiva de las

proteínas). La técnica del ultrasonido, recomienda la combinación de 0.5% de SDS y alta intensidad de ultrasonido para mejorar el almidón producido con bajo contenido de proteína residual, esta técnica ha sido evaluada como un método alternativo para aislar las proteínas de almidones sin el uso de químicos como en el método tradicional de remojo alcalino.

Por los estudios ya mencionados y pruebas realizadas, el procedimiento propuesto y evaluado para extraer las proteínas del almidón de maíz comprende las siguientes etapas:

- a) El endospermo obtenido del proceso de descascarado y previamente secado, es tratado en un molino de martillos para disminuir el tamaño de partícula.
- b) Se toma una porción de muestra y es suspendida en una solución de 0.5M de NaCl a una relación 1:5. La suspensión es agitada 15 minutos a temperatura ambiente.
- c) Se da un tratamiento en un equipo de ultrasonido por 30 minutos a temperatura ambiente.
- d) Los residuos de NaCl son retirados con un lavado en agua durante 15 minutos después de haber centrifugado la suspensión.
- e) El sedimento es suspendido en una solución de etanol 70%, agitando por 15 minutos a temperatura ambiente. El Tratamiento con ultrasonido es de 30 minutos manteniendo las condiciones.
- f) Una vez retirada la solución de etanol 70% por centrifugación, el sedimento es lavado con agua.

- g) Se da un tratamiento con etanol 70% + 0.5% de Acetato de Sodio, manteniendo las condiciones de agitación y ultrasonido. Sin dar un lavado y únicamente centrifugando, el sedimento recibe un tratamiento con etanol 70% + agente reductor 1% (2-ME), agitando y aplicando el ultrasonido a las mismas condiciones.
- h) Después de centrifugar, los residuos de etanol y agente reductor son retirados con lavados sucesivos de etanol 70%, etanol 60% y agua a temperatura ambiente.
- i) El almidón obtenido es secado a 30°C durante 6 horas.

5.3.3 Caracterización del almidón obtenido

5.3.3.1 Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción de Agua (IAA)

Se determinaron según el método propuesto por Anderson (1994), el cual permite cuantificar la cantidad de agua incorporada al almidón y el porcentaje de sólidos solubles disueltos en agua a 30°C. Estas características fisicoquímicas fueron realizadas por duplicado. Se colocaron 2.5 gramos de cada muestra de almidón en tubos de centrifuga previamente pesados, a cada tubo se le adicionaron 40ml de agua destilada. Posteriormente, los tubos se colocaron en agitación a 30°C por 30 minutos y se centrifugaron a una velocidad de 3000 r.p.m. durante media hora.

Para el Índice de Solubilidad en Agua, se tomaron 10ml del sobrenadante de cada tubo y se transfirieron a capsulas previamente pesadas. Las muestras se colocaron en una estufa a 105°C hasta evaporar todo el líquido. El resto del sobrenadante de cada tubo se midió para obtener el volumen del líquido total. El ISA se determino mediante la ecuación siguiente:

$$ISA = \frac{A \times (B/10)}{C} \times 100$$

Donde: A = sólidos disueltos en 10ml

B = ml totales de sobrenadante

C = peso de la muestra seca

Para determinar el Índice de Absorción de Agua (IAA), se peso el tubo con la muestra de almidón húmedo y por diferencia se obtuvo el peso del sedimento. El IAA se expresa como g de agua/g de muestra seca, se calcula de la siguiente forma:

$$IAA = \frac{\text{Pesosedimento}}{\text{Pesomuestra}}$$

5.3.3.2 Viscosidad

Se determino en el equipo "Rapid Visco Analyzer", modelo 4C (Newport Scientific PTY Ltd; Sydney Australia). El contenido de humedad de las muestras fue determinado de acuerdo al método No. 14-15 de la AACC y ajustado a 14% (base húmeda).

Fueron usados dos gramos de muestra, adicionando agua destilada hasta obtener un peso constante total de agua y muestra de 28 gramos. Para la determinación de la viscosidad se utilizó el siguiente perfil de tiempo - temperatura: Homogenización de la muestra durante 8 segundos, 5 minutos de calentamiento desde 50 hasta 90°C, permaneciendo constante a esta temperatura durante 4.5 minutos. Posteriormente la muestra se enfrió a 50°C en un tiempo de 5.5 minutos. El tiempo total de análisis fue de 15 minutos manteniendo una velocidad de agitación constante de 160 rpm, la viscosidad fue reportada en centipoises. La curva completa que se obtiene permite calcular para las muestras de almidón la viscosidad máxima a 90°C durante el

calentamiento en el ciclo de temperatura constante a 90°C y la viscosidad máxima a 50°C durante el ciclo de enfriamiento (retrogradación del almidón).

5.3.3.3 Almidón Dañado

Según el método desarrollado por Boyaci, H. J. 2004. El método se basa en la idea que la diferencia entre el contenido de materia soluble de los extractos preparados para algunas harinas y aquellos sin alfa amilasa es principalmente debido a la acción de la alfa amilasa sobre los gránulos dañados. La base de la extracción de el método es similar al método de la AACC (76 – 30 A).

Se utiliza un refractómetro (Tago Made in Japan) para medir °Brix de soluciones en lugar de determinar azúcares reductores. El tamaño de la muestra y el periodo de incubación del método de la AACC fue optimizado por el método de superficie de respuesta.

5.3.4 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se utilizará la metodología de superficies de respuesta (MSR) a través del sistema de Análisis Estadístico SAS versión 6.12 TS020. La significancia de los modelos será probada por el análisis de varianza (prueba de F) y la influencia de las variables será observada a través de los gráficos de superficie. Para el proceso de acondicionamiento o remojo y para la molienda en el molino de bolas se empleó un diseño central compuesto con 13 tratamientos y 5 repeticiones en el punto central.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Análisis proximal

El análisis proximal fue realizado a la muestra de almidón que se obtuvo por el método propuesto en las condiciones de mejor separación y a un almidón comercial de maíz como control. Los resultados se presentan en el cuadro número 6.

Cuadro 6. Composición proximal del almidón de maíz obtenido por molienda seca.

Muestra	Humedad (%)	*Proteínas (% bs.)	Lípidos (% bs.)	Cenizas (% bs.)	Carbohidratos (% bs.)
Almidón Producido	9.5	0.16	0.6	0.4	98.84
Almidón Comercial	10.9	0.35	0.8	0.5	98.35

*N x 6.25

Los resultados indican que el almidón extraído a través de la molienda seca y extracción de proteínas por sonoquímica tiene un contenido de proteína menor al obtenido por el método de molienda húmeda, los demás componentes no difieren mucho en la composición.

6.2 Separación de los componentes del maíz

El siguiente cuadro expresa los resultados de la separación de los componentes del maíz.

Cuadro 7. Separación de los componentes del maíz.

Ensayo	Variables Dependientes		Variables Independientes	
	X1	X2	% Endospermo	% PG
1	25	10	84.99	15.00
2	25	30	84.87	15.12
3	40	10	83.64	16.35
4	40	30	81.56	18.43
5	32.5	20	83.34	16.65
6	32.5	20	83.22	16.77
7	32.5	20	81.80	18.19
8	32.5	20	83.17	16.82
9	32.5	20	83.08	16.91
10	43	20	81.18	18.81
11	22	20	81.81	18.18
12	32.5	34	83.52	16.47
13	32.5	6	82.89	17.10

X1 = Temperatura (°C)

X2 = tiempo (min.)

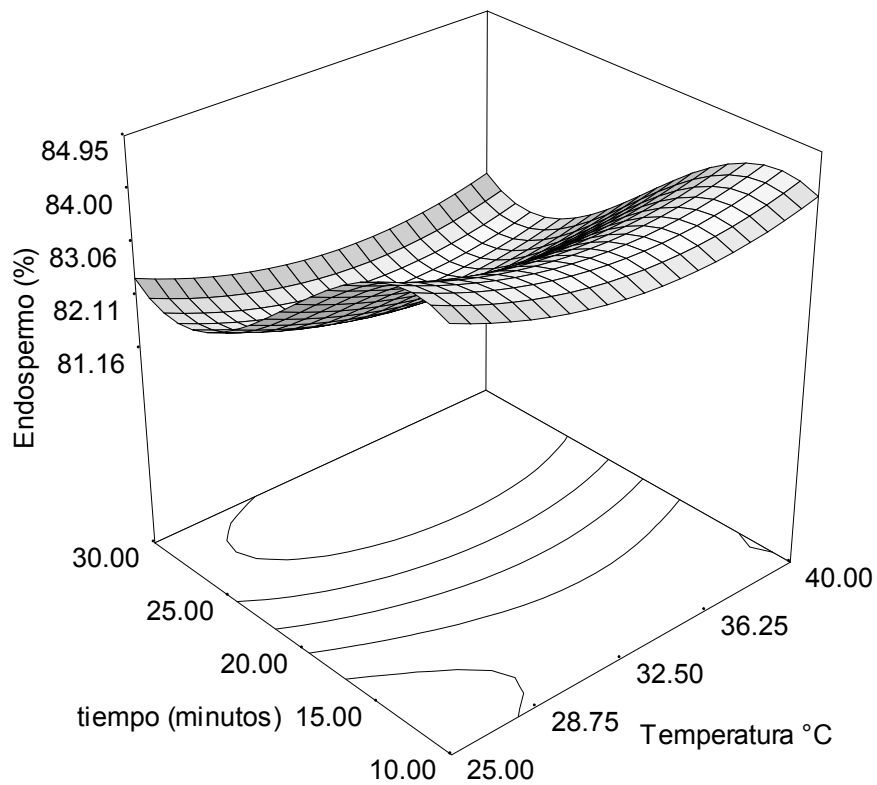
6.2.1 Separación del endospermo de maíz

La ecuación final en términos de los factores actuales, para la separación del endospermo de maíz es:

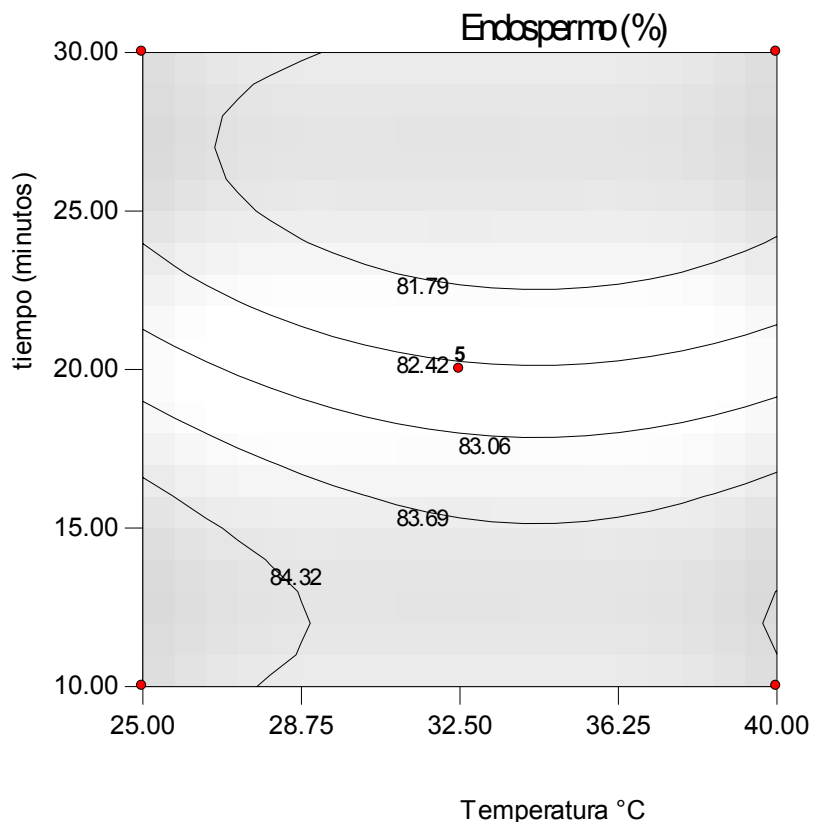
$$\text{Endospermo (\%)} = 88.58 - 0.75X_1 + 1.61X_2 + 0.011X_1^2 - 0.097X_2^2 + 0.001649X_2^3$$

El modelo de regresión para la variable respuesta ($Y = \text{Endospermo } \%$) debe ser usado cuidadosamente considerando que el coeficiente de determinación es adecuado ($R^2 = 0.60$), sin embargo la probabilidad del modelo es alta ($\text{Prob} > F = 0.1916$). Esto indica que los términos del modelo propuesto no se ajustan adecuadamente a los datos experimentales.

El comportamiento de la separación de endospermo se puede observar en la grafica 13. El valor máximo se obtuvo en condiciones de temperatura de 25°C y un tiempo de 10min ($\text{Endospermo} = 84.99\%$), mientras que el valor mínimo ($\text{Endospermo} = 81.18\%$) se presentan a 40°C y 20min.



(a)



(b)

Figura 13. Separación del Endospermo de maíz: a) Superficie de respuesta, b) Contorno.

La separación del endospermo disminuye cuando se presentan valores de temperatura y tiempo altos, en estas condiciones se obtiene la menor separación de endospermo, sin embargo, cuando se manejan temperaturas entre 25 – 28°C combinadas con tiempos de acondicionamiento entre 10 y 15 minutos se pueden obtener buenos resultados de separación. Muy probablemente un alto contenido de humedad dificulta el adecuado funcionamiento del equipo y por consecuencia el grano de maíz no puede ser fraccionado correctamente, debido a que los componentes de la cáscara al hidratarse en exceso se adhieren excesivamente al endospermo dificultando su remoción.

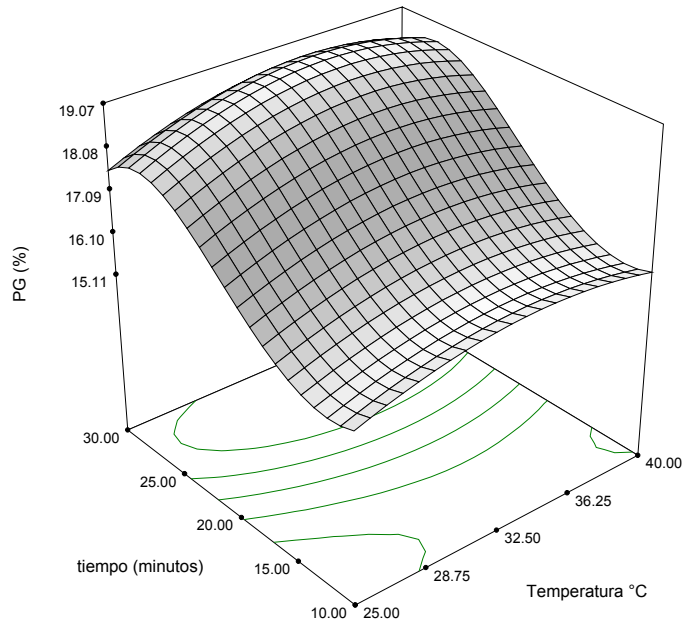
6.2.2 Separación del pericarpio de maíz

El modelo ajustado para la separación del pericarpio, germen y puntas (PGP) del grano de maíz es:

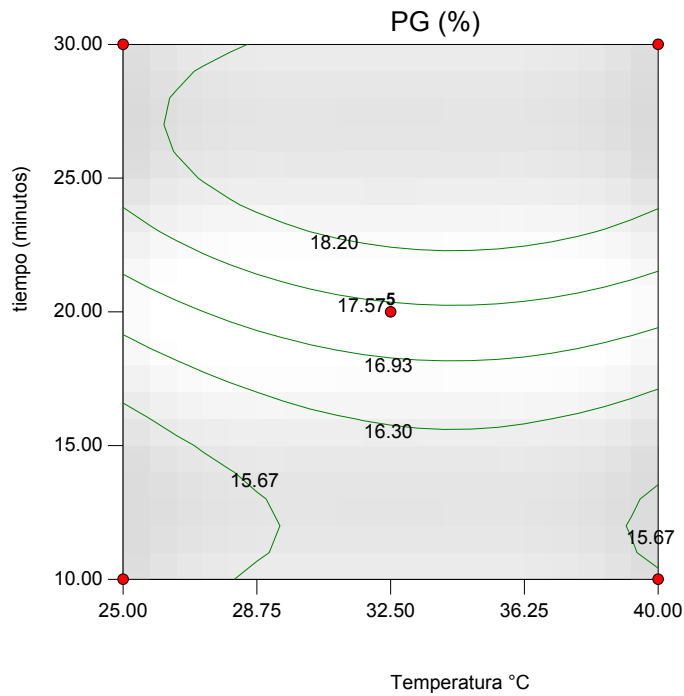
$$\text{PGP (\%)}^{-1} = 0.079 - 2.623\text{E-}03X_1 + 5.752\text{E-}03X_2 + 3.830\text{E-}05X_1^2 - 3.473\text{E-}04X_2^2 + 5.929\text{E-}06X_2^3$$

El modelo de regresión usado para la variable respuesta ($Y = \text{PGP (\%)}^{-1}$) debe ser usado, al igual que para el endospermo, con cierta cautela ya que los valores del coeficiente de determinación ($R^2 = 0.62$) y de la probabilidad del modelo ($\text{Prob} > F = 0.1598$) indican que el modelo propuesto tiene un moderado ajuste a los datos experimentales y el valor de F indica que los factores X_1 y X_2 no presenta varianza, por lo que las variables seleccionadas dentro del intervalo o niveles no presentan mayor variación.

En la grafica 14 se observa el comportamiento en la separación del PGP obtenido para diferentes valores de Temperatura y tiempo. Cuando hay un incremento en el tiempo de acondicionamiento el PGP aumenta. Para cambios en los niveles del factor Temperatura no se observa modificaciones en los valores de PGP. Las condiciones en las que se tiene una mayor separación de PGP son para $X_1 = 25^\circ\text{C}$ y $X_2 = 10\text{min}$, valores de los factores que coinciden con la separación de endospermo.



(a)



(b)

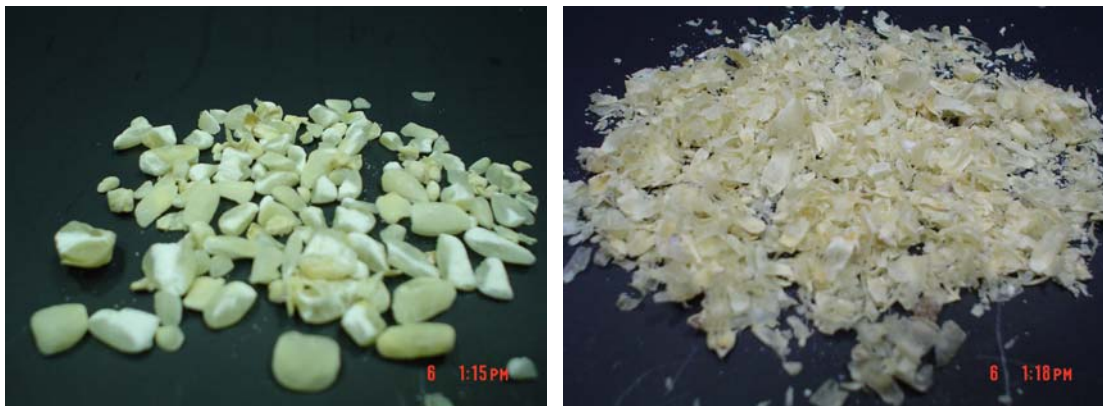
Figura 14. Separación de Pericarpio, Germen y Puntas del grano de maíz. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.

6.2.3 Fracciones de Endospermo y Pericarpio del grano de Maíz

En las imágenes (figura 15) a seguir se ilustran las fracciones separadas del grano de maíz, pudiendo apreciarse el buen funcionamiento del proceso y equipo utilizado.



(a)



(b)



(c)

Figura 15. Fracciones del grano de maíz: (a), (b) Endospermo y PGP; (c) Endospermo molido.

6.3 Contenido de Fibra Cruda

La fibra cruda es un componente presente en un 87% en el pericarpio y en un 8.8% en el germen (Watson, 1987). El contenido de fibra cruda en el endospermo es mínimo, por esta razón se tomo como un factor para determinar el endospermo que debe utilizarse en el proceso de separación de almidón, aquel que contenga el mínimo valor de fibras. Las muestras seleccionadas de endospermo analizadas y los resultados de contenido de fibra cruda se expresan en el cuadro siguiente:

Cuadro 8. Contenido de fibra cruda del endospermo obtenido por el método de descascarado.

Muestra	Endospermo (%)	Fibra Cruda (%)
7	81.8	0.097
10	81.18	0.0518
4	81.56	0.0633
11	81.81	0.0577

El endospermo obtenido al descascarar el grano de maíz corresponden a los citados en la literatura (Watson, 1987) que se encuentran dentro de un intervalo de 80 – 85%. La muestra 11 presenta un menor contenido de fibra cruda y por lo tanto es baja la cantidad de las fracciones de PGP que no se separaron del endospermo. Por las razones mencionadas se selecciono la muestra 11 (20°C y 20min) para continuar con el proceso de obtención de almidón y extracción de las proteínas.

6.4 Molienda del endospermo en molino de bolas

En el supuesto que la harina de endospermo con el menor tamaño de partículas debería ser la que presente la mayor separación de proteínas, se realizo la molienda por diversos procesos logrando seleccionar el molino de bolas. La finalidad de usar el molino de bolas, evidentemente es para disminuir el tamaño de partícula con el objeto de lograr un proceso de extracción de las proteínas que nos permita lograr un almidón con un contenido residual final de proteínas de máximo 0.5%. El tamaño de partícula deseado es por debajo de las 100micras, siendo éste el valor recomendado para extraer proteínas eficientemente y no afectar sus propiedades funcionales (Letang, 2001)

A partir de la muestra seleccionada con el menor contenido de fibras fue tratada en un molino de bolas a diferentes condiciones de Humedad (X_1) y tiempo (X_2).

Los parámetros para la molienda y la retención del endospermo al ser tamizado en mallas 60, 80, 100, 200, se expresan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Molienda del endospermo (Retención, %).

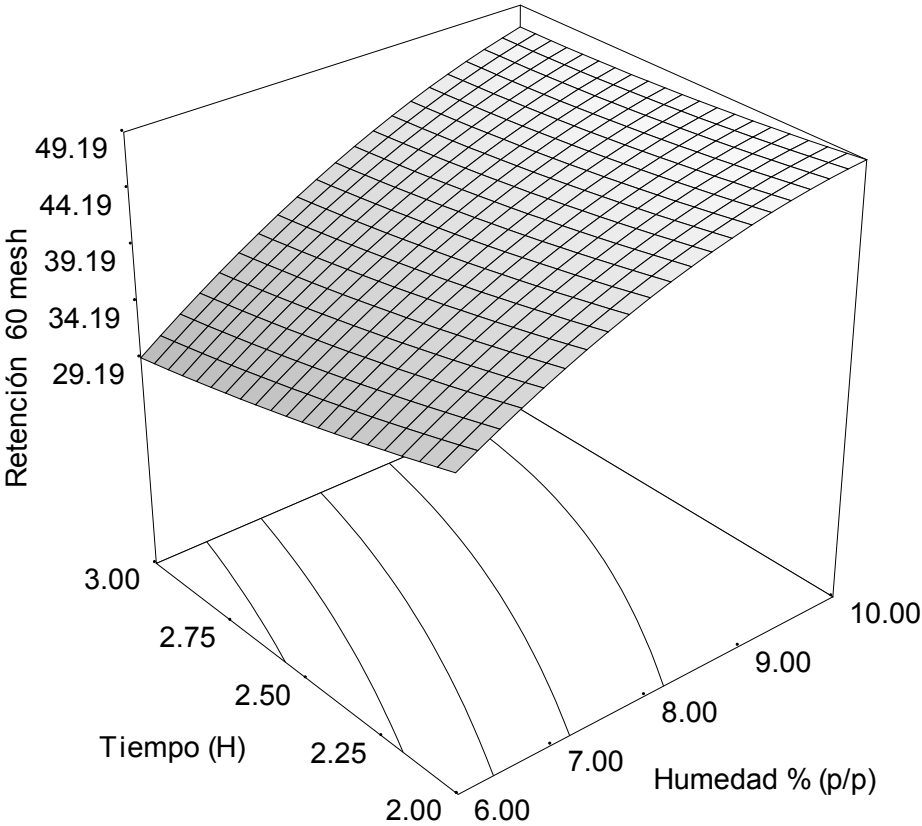
Corrida	Humedad (%)	tiempo (h)	Malla 60 (%bs)	Malla 80 (%bs)	Malla 100 (%bs)	Malla 200 (%bs)	Fondo (%bs)
1	8	2.5	41.52	4.34	1.3	4.13	58.47
2	10	2	50.22	3.33	2.66	3.77	48
3	8	2.5	43.47	4.13	1.52	4.78	55.65
4	10.83	2.5	47.86	5.61	2.02	1.57	52.35
5	6	2	39.78	3.4	1.27	2.12	60.63
6	8	2.5	41.52	4.13	1.95	3.47	58.91
7	8	2.5	44.56	4.34	1.52	5.21	55.21
8	10	3	48	5.11	2.66	4	50.22
9	8	1.75	45.43	5	1.95	3.04	54.34
10	8	2.5	41.73	4.56	1.73	4.13	57.82
11	6	3	31.27	2.76	1.27	3.19	68.08
12	5.17	2.5	25.05	3.78	1.68	5.68	67.78
13	8	3.25	38.47	4.56	3.26	5	57.17

6.4.1 Harina retenida en malla 60 mesh

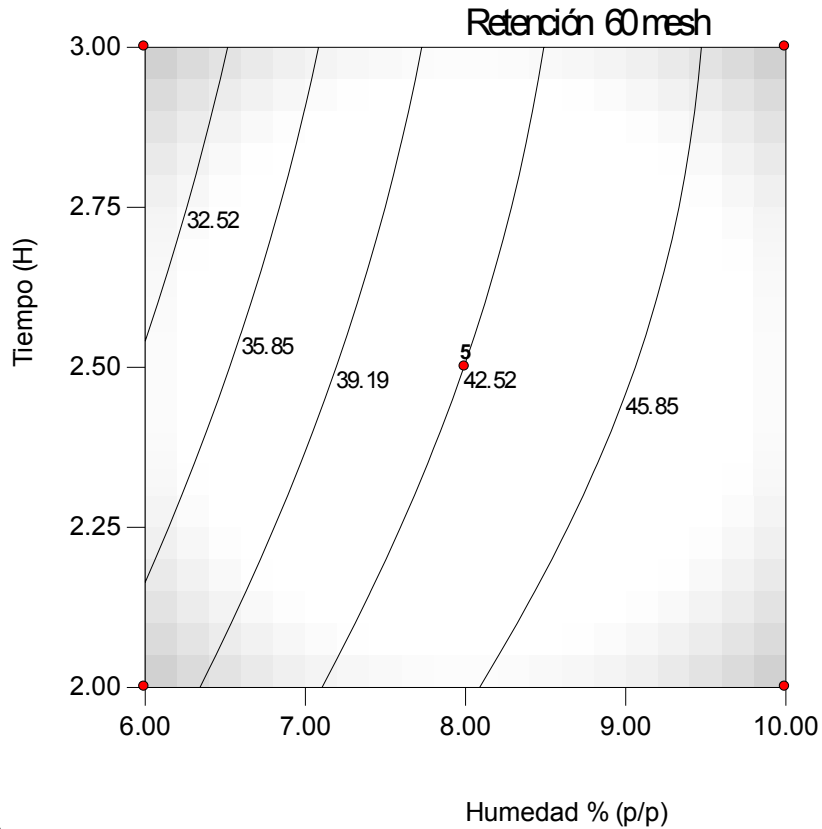
Los datos obtenidos sobre la fracción de harina retenida en la malla 60 después de la molienda, fueron analizados estadísticamente a través de ANOVA y prueba de distribución de F, obteniendo que el modelo de regresión usado para la variable respuesta ($Y = \text{Retención } 60 \text{ mesh}$) puede ser usado con confianza ya que los valores del coeficiente de determinación y de probabilidad ($R^2 = 0.9471$ y $\text{Prob} > F = 0.0002$) indican que el modelo se ajusta significativamente a los datos experimentales. El modelo matemático ajustado en términos de los factores actuales, para la variable respuesta retención 60 mesh es:

$$\text{Retención } 60 = 32.62 + 8.88X_1 - 27.20X_2 - 0.57X_1^2 + 1.89X_2^2 + 1.57X_1X_2$$

Con este modelo fue realizada la grafica 17 donde se observa el comportamiento de la Retención en la malla 60. El mayor efecto se observa a modificaciones del contenido de humedad y en menor efecto a cambios en el tiempo de molienda Para el factor Humedad, la retención en malla 60 aumenta para mayores contenidos de humedad y disminuye a bajas humedades en la molienda. El tiempo de molienda modifica levemente estos resultados, cuando hay un incremento en el tiempo de molienda la retención en malla 60 disminuye. La menor retención se logro a una humedad de 5% y un tiempo mayor de 2.5h.



(a)



(b)

Figura 17. Retención 60 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno de nivel.

6.4.2 Harina retenida en malla 80 mesh

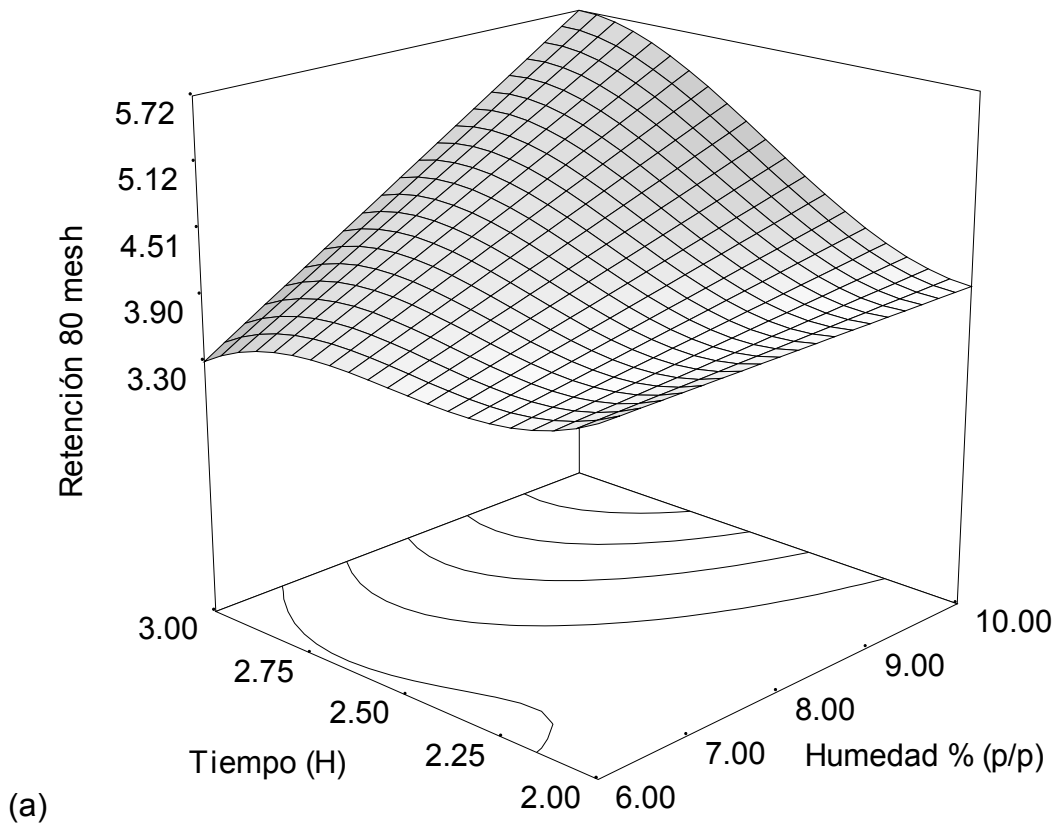
El modelo de regresión usado para la variable respuesta ($Y =$ Retención 80 mesh) puede ser usado con cierta cautela ya que los valores del coeficiente de determinación y de la probabilidad del modelo ($R^2 = 0.656$ y $\text{Prob} > F = 0.1165$) indican que el modelo no se ajusta a los resultados experimentales. La ecuación en términos de los factores actuales, para la variable respuesta retención 80 mesh se presenta a continuación:

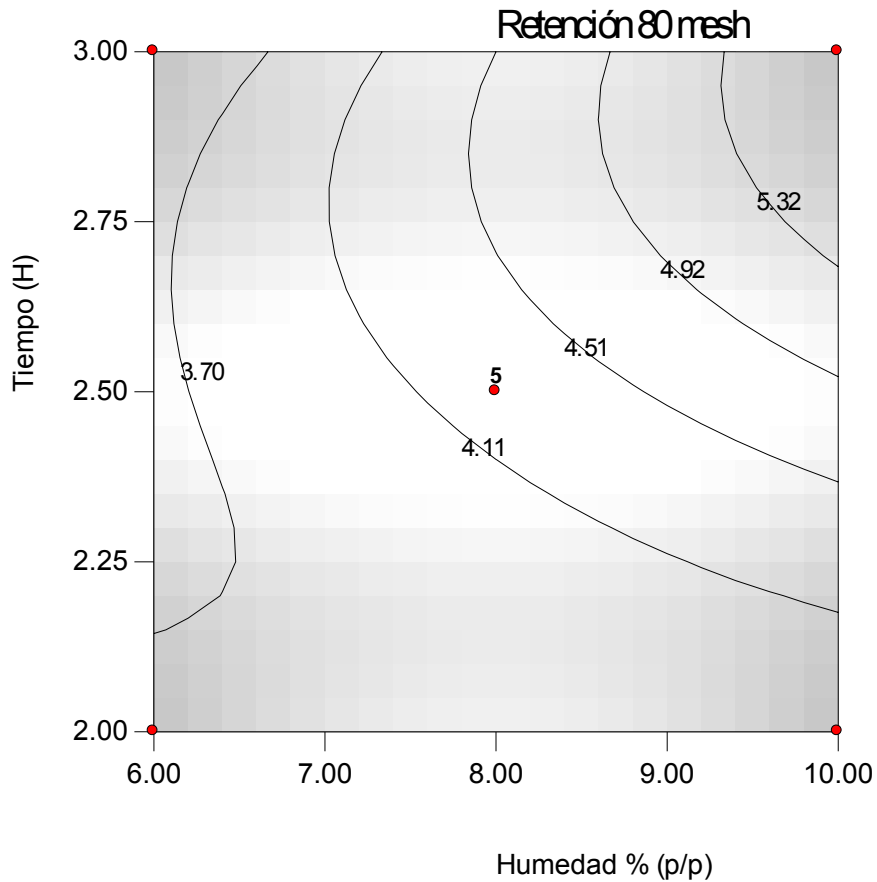
$$\text{Retención 80} = 64.80 - 1.21X_1 - 69.03X_2 + 26.35X_2^2 + 0.61X_1X_2 - 3.52X_2^3$$

Donde: X_1 = Humedad (%)

X_2 = tiempo (min.)

En la grafica 18 de superficies de respuesta que se utilizara como tendencias del efecto de las variables humedad y tiempo en la respuesta retención en la malla 80. Se observa que ambas variables tienen un efecto significativo en la reducción de tamaño de partículas retenidas en malla 80, es decir que incrementos de humedad y tiempo se tiene aumentos en los valores de retención en esta malla. Dicho de otra forma, mayores valores de humedad y tiempo de molienda no reduce el tamaño de partículas. La reducción del tamaño de partículas solo se observa a menores de 7% de humedad y no tiene influencia significativa el tiempo de molienda. La menor retención se logro a una humedad de 6% y un tiempo de 3h.





(b)

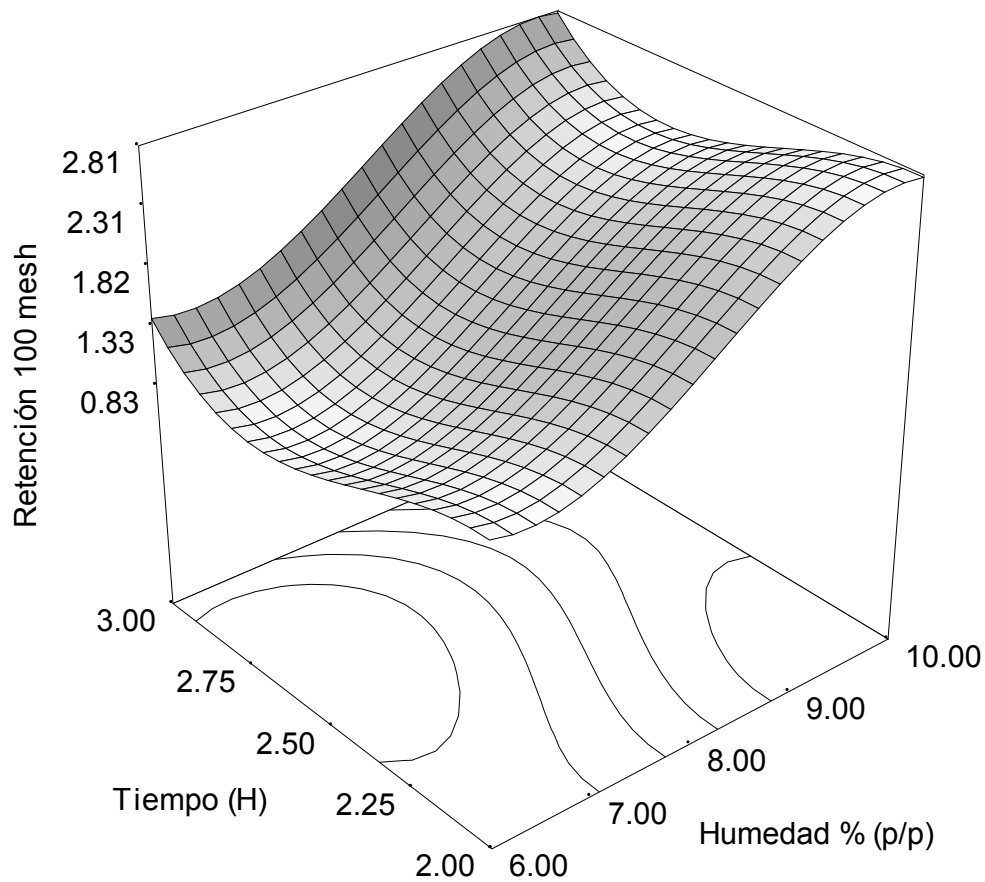
Figura 18. Retención 80 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno de nivel.

6.4.3 Porcentaje de retención 100 mesh

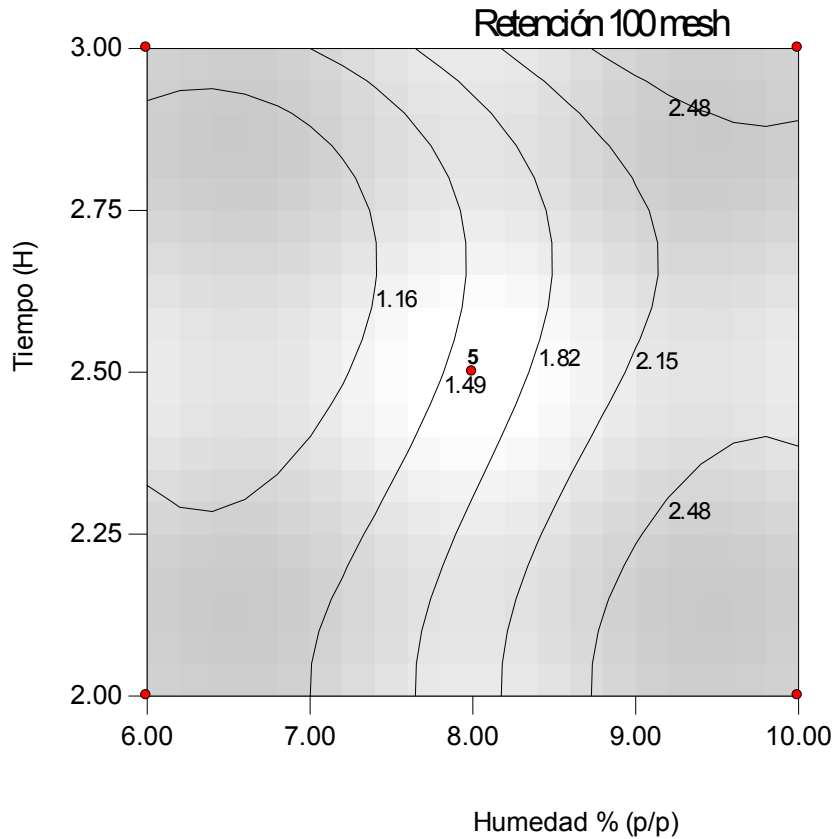
El análisis estadístico de los datos experimentales a través del ANOVA y distribución de F indican que el modelo de regresión usado para la variable respuesta ($Y =$ Retención 100 mesh) puede ser usado con confianza ya que los valores del coeficiente de determinación y de la probabilidad del modelo ($R^2 = 0.92$ y $\text{Prob} > F = 0.0051$) indican que los términos del modelo se ajustan significativamente al modelo. La ecuación final en términos de los factores actuales, para la variable respuesta retención 100 mesh es:

$$\text{Retención } 100 = -10.48 - 13.39X_1 + 59.85X_2 + 1.74X_1^2 - 26.05X_2^2 - 0.072X_1^3 + 3.71X_2^3$$

En la grafica 19 se observa el comportamiento de la Retención en la malla 100 obtenido para diferentes valores de humedad y tiempo. Cuando hay un incremento en el tiempo de molienda la retención presenta un comportamiento discontinuo, con una ligera tendencia a disminuir. Para el factor humedad, la retención aumenta cuando hay un incremento en la humedad de las muestras. La menor retención se logro a una humedad de 6% y un tiempo de 2h.



(a)



(b)

Figura 19. Retención 100 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno de nivel.

6.4.4 Porcentaje de retención 200 mesh

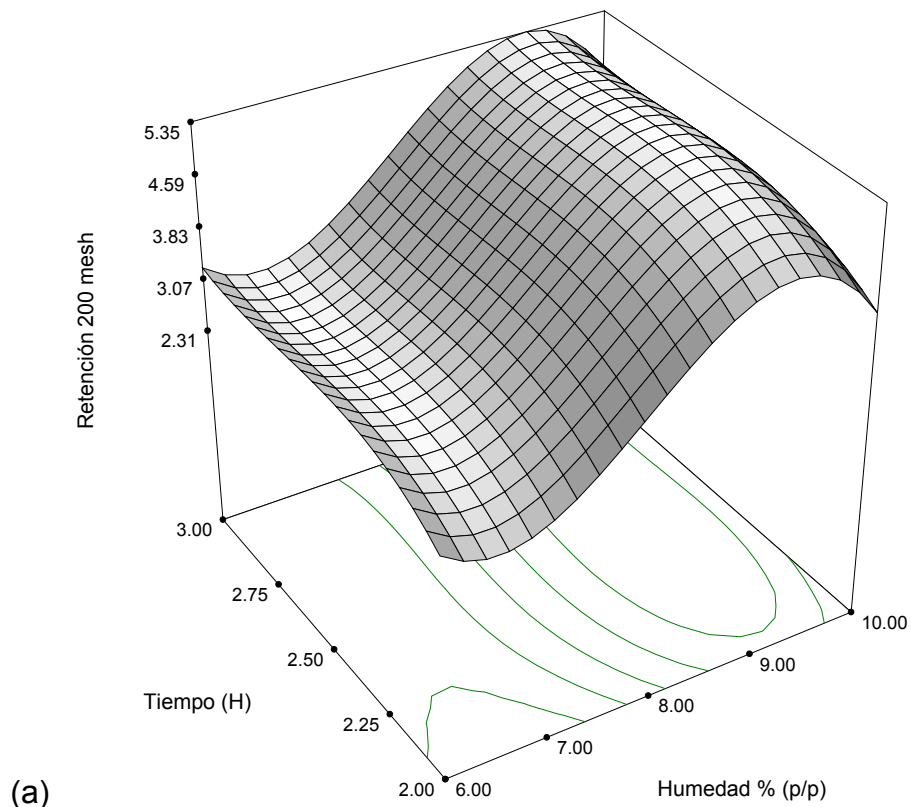
El modelo de regresión usado para la variable respuesta ($Y = \text{Retención 200 mesh}$) puede ser usado con confianza ya que los valores del coeficiente de determinación y de la probabilidad del modelo ($R^2 = 0.85$ y $\text{Prob} > F = 0.0276$) indican que los términos del modelo se ajustan estadísticamente al modelo. La ecuación final en términos de los factores actuales, para la variable respuesta retención 200 mesh se presenta a continuación:

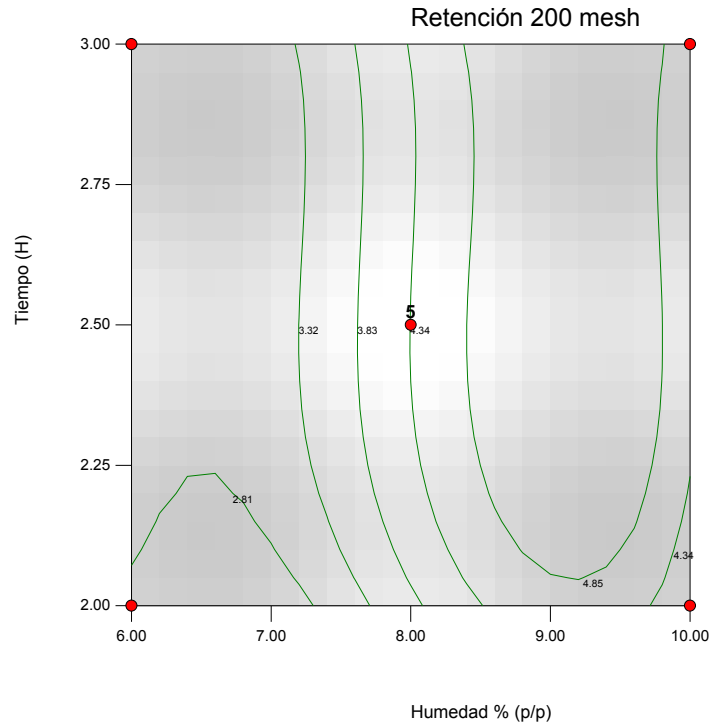
$$\text{Retención 200} = 64.72 - 46.30X_1 + 61.11X_2 + 6.08X_1^2 - 23.28X_2^2 - 0.26X_1^3 + 2.94X_2^3$$

Donde: X_1 = Humedad (%)

X_2 = tiempo (min.)

En la grafica 20 se observa el comportamiento de la fracción de harina molida por el molino de bolas retenido en la malla 200 para diferentes valores de humedad y tiempo de molienda. El factor humedad es la variable que mas afecta en la retención a 200 mesh y el tiempo de molienda no tiene un efecto significativo. Incrementos de la humedad produce mayores valores de retención de este tamaño de partículas de harina de maíz, debido probablemente a que mayores valores humedad actúan como plastificante en la harina evitando su fragmentación durante la molienda. En la gráfica de contorno se puede apreciar el efecto significativo de la variable humedad en la retención en la malla 200. Siendo por tanto, la humedad un factor importante que afecta la disminución del tamaño de partícula al ser tratada en molino de bolas y lograr un tamaño de partícula por debajo de las 70 micras.





(b)

Figura 20. Retención 200 mesh. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno.

6.4.5 Porcentaje de retención Fondo

El modelo de regresión usado para la variable respuesta ($Y = \text{Retención Fondo } \%$) puede ser usado con confianza ya que los valores del coeficiente de determinación y de la probabilidad del modelo ($R^2 = 0.93$ y $\text{Prob} > F = 0.0005$) indican que los términos de modelo se ajustan estadísticamente a los datos experimentales. La ecuación final en valores actuales, para la variable respuesta retención Fondo es:

$$\text{Retención Fondo } (\%) = 41.21 - 4.53X_1 + 34.34X_2 + 0.28X_1^2 - 4.09X_2^2 - 1.31X_1X_2$$

A través de la ecuación indicada arriba se realizó el gráfico 21 donde se observa el comportamiento de retención en el fondo obtenido para diferentes valores de Humedad y tiempo. Para el factor Humedad, la retención aumenta cuando hay un

descenso de la humedad en la molienda. La mayor retención se logro a una humedad de 6% y un tiempo de 3h. El tiempo no tiene un efecto importante en este resultado.

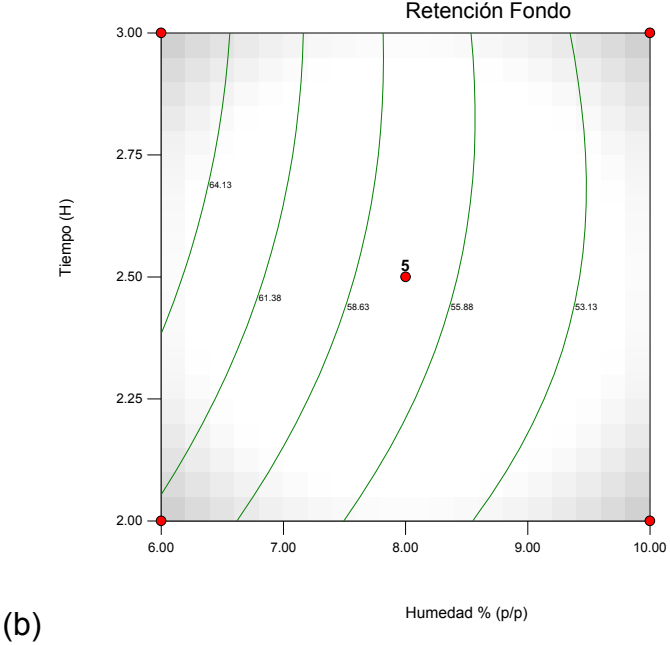
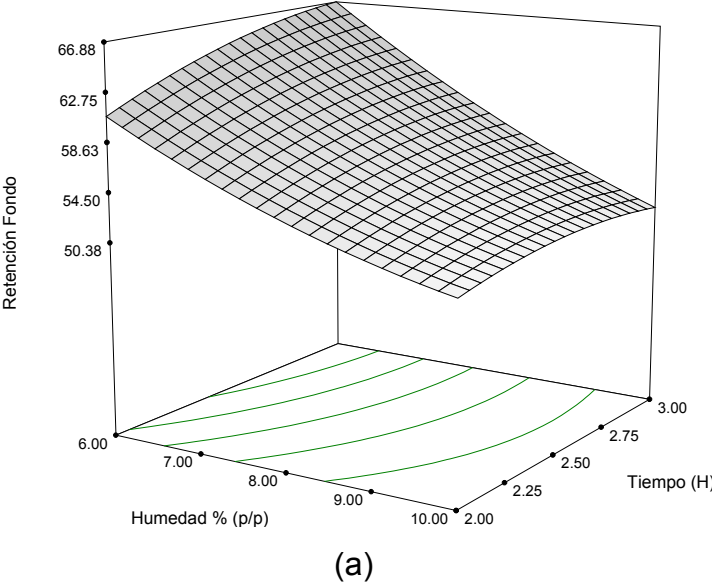


Figura 21. Retención Fondo. (a) Superficie de respuesta y (b) Contorno de nivel.

6.5 Determinación de almidón dañado

El endospermo obtenido del proceso de descascarado y tratado en el molino de bolas sufrió daño mecánico que afecta directamente al tamaño de partícula y consecuentemente se produce un determinado daño en el granulo de almidón. El daño provocado al almidón puede modificar considerablemente las propiedades funcionales, por esta razón el porcentaje de almidón dañado fue determinado. Según Tester (1994), los almidones molidos por bolas no son encontrados en sistemas alimenticios y el proceso de molienda de bolas produce daños en el almidón con características diferentes a los daños causados por molinos de rodillos y otras formas físicas de procesamiento que no involucran calor.

Los resultados obtenidos de almidón dañado para las muestras molidas por el molino de bolas a diferentes humedades y tiempo de proceso sin realizar tamizado, se presentan en el cuadro 10.

Cuadro 10. Porcentaje de almidón dañado en las muestras tratadas en el molino de bolas.

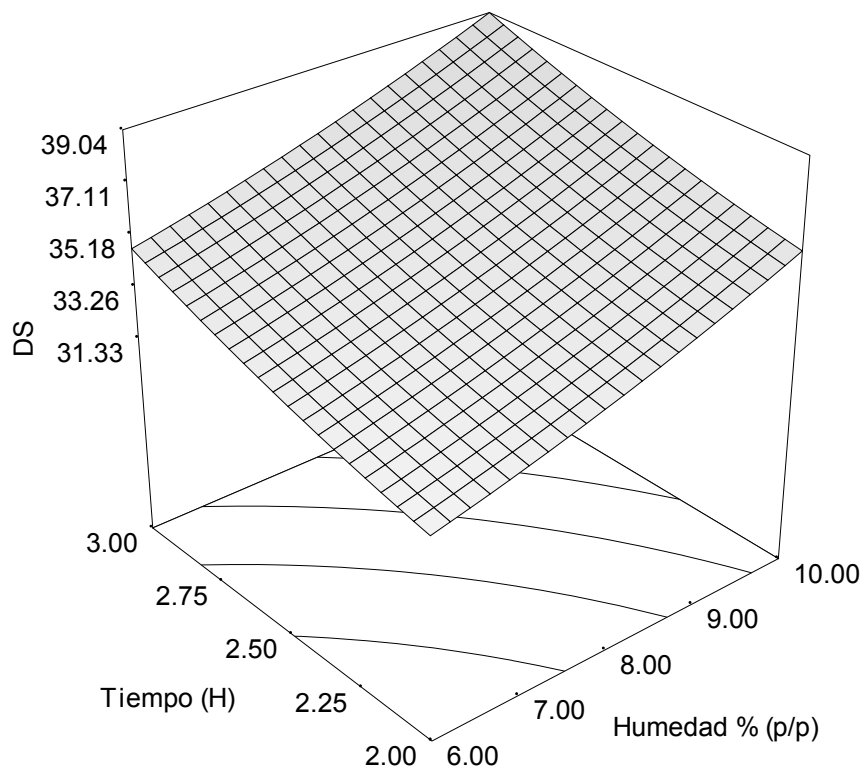
Muestra	°Brix	Almidón Dañado (%)
1	6.9	35.53
2	7	36.44
3	7	36.44
4	7.2	38.26
5	6.5	31.88
6	6.6	32.8
7	6.9	35.53
8	7.2	38.26
9	6.5	31.88
10	6.6	32.8
11	6.8	34.62
12	6.5	31.88
13	7.2	38.26

Con los datos experimentales de la tabla 10 se realizó el análisis estadístico obteniendo el modelo de regresión para la variable respuesta (Y = Almidón Dañado %). Este modelo puede ser usado con confianza ya que los valores del coeficiente de determinación y de la probabilidad del modelo ($R^2 = 0.81$ y $\text{Prob} > F = 0.0057$) indican que los términos del modelo se ajustan estadísticamente a los resultados experimentales de forma significativa.

La ecuación en valores actuales para la variable respuesta almidón dañado es presentada a seguir:

$$\text{Almidón Dañado (\%)} = 29.10 - 0.054X_1 - 2.25X_2 + 0.071X_1^2 + 1.13X_2^2$$

A través de este modelo se realizó el gráfico 22 de superficie de respuesta.



(a)

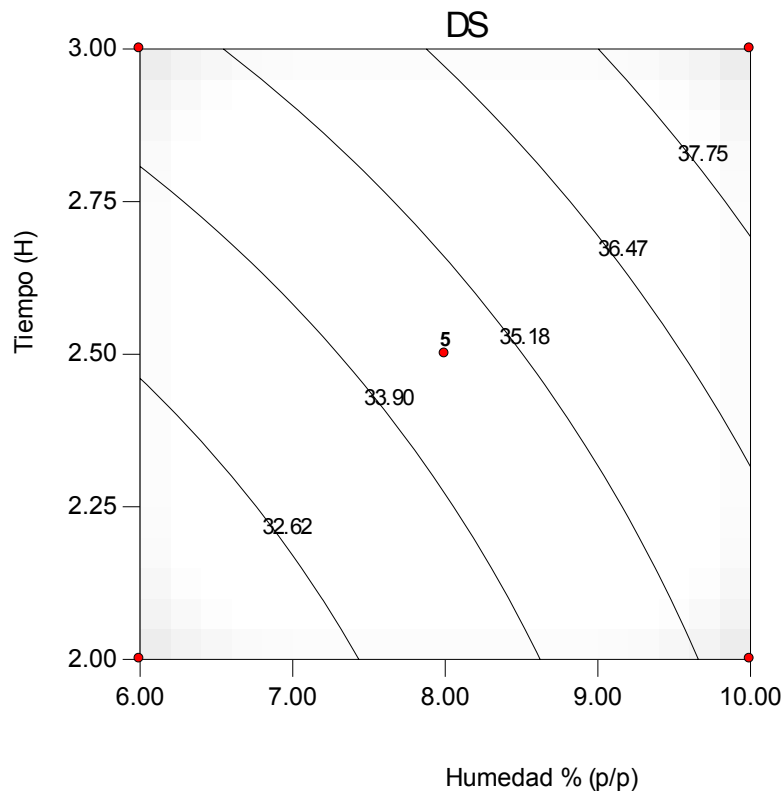


Figura 22. Almidón dañado en el proceso de molienda en el molino de bolas

Observando que incrementos de humedad y tiempo de molienda produce mayor daño en la estructura del almidón. Los máximos daños provocados al almidón se presentaron cuando se tiene la combinación de tiempos largos y humedades altas, sin embargo, también se puede observar que es más significativo el efecto de la humedad que el tiempo de molienda en el porcentaje de almidón dañado.

Los valores de almidón dañado que se obtuvieron (31.88 – 38.26%) son elevados, considerando que los porcentajes reportados en almidones comerciales no exceden el 2%. Según Morrison (1994), almidones de maíz y trigo cuando fueron molidos por molinos de bolas para obtener varios niveles de almidón dañado, tienen grandes pérdidas en el orden de cristalinidad y su contenido en carbohidratos de doble hélice. La entalpía y la temperatura de gelatinización de los almidones disminuyen cuando incrementan los niveles de almidón dañado, debido a que requieren menor energía

para transformarlo en geles. Por este motivo, el uso de molino de bolas no se recomienda para la producción de almidón entero o sin daño, pero si podría ser utilizado en almidones que si requieran determinado daño para la aplicación en otros usos industriales (almidón resistente, producción de alcohol, cosméticos y almidones modificados).

Como el objetivo de la tesis es la obtención de almidón en su estado natural y por los resultados obtenidos en esta etapa de investigación no podrían ser utilizados el molino de bolas para la producción de almidón en su estado natural, por lo que no se recomendaría este proceso de extracción para este fin.

El objetivo siguiente de separar las proteínas del endospermo de maíz se realizo sin la molienda por molino de bolas. Para obtener un almidón con el menor daño posible se decidió extraer las proteínas con el endospermo separado en la etapa de descascarado realizando una molienda con el molino de martillos (malla 60 mesh) sin tamizar.

6.6 Extracción de las proteínas

La extracción de proteínas se realizo inicialmente con la fracción retenida en el fondo (menor a 200 mesh) obtenida al tamizar la muestra que fue molida en el molino de bolas, se utilizo el método de Osborne (1924) obteniendo un contenido de proteína residual 4.2% a 4 horas de tratamiento. Considerando que el método de Osborne (1924) no solubiliza un 17% del total de las proteínas se utilizaron los métodos de Landry and Moureaux (1970) y Paulis and Wall (1971), los cuales utilizan 2-ME como agente reductor, logrando un contenido residual del 1.83%. Los métodos utilizados incluyen soluciones salinas, etanol a diversas concentraciones, agentes reductores (2-ME) y lavados con agua, sin embargo, se realizaron pruebas con ultrasonido y etanol al 70% logrando un contenido de proteína final de 2.56% en la muestra estudiada.

Considerando los métodos aplicados y la literatura consultada se propone un método de extracción de proteínas en el cual se utilizan los fundamentos propuestas por Osborne (1924), pero la extracción se complementa con agentes reductores para extraer al máximo las fracciones de zeínas y globulinas, además de realizar un tratamiento con ultrasonido el cual afecta directamente el proceso de extracción de proteínas. El contenido residual de proteínas en el almidón estudiado, utilizando el método propuesto fue de 0.16%.

Es importante mencionar que este resultado fue obtenido a partir de la muestra de endospermo la cual fue molida en el molino de martillos y no recibió tratamiento en el molino de bolas, considerando que las muestras a las cuales se les extraía la proteína y que habían sido tratadas en molino de bolas, el proceso de extracción se dificultaba y por lo tanto en contenido residual era mayor al deseado. Los resultados coinciden con los estudios realizados por Dickey et al. 1998; en los cuales encontraron que a un tamaño de partícula de 2mm presenta más masa convectiva transferida que a 20 μ m, facilitando la extracción de las proteínas.

Los resultados de los métodos utilizados para la extracción de las proteínas se presentan en el cuadro 11.

Cuadro 11. Extracción de proteínas del almidón de maíz por diferentes métodos.

Método	Solución Salina	Solvente	Acetato de Sodio	Agente Reductor	Ultrasonido	Lavados	Proteína (%)
Osborne	si	etanol 70%	no	no	no	si	4.2
Landry and Moureaux	si	etanol 70%	si	si	no	si	1.83
Ultrasonido	si	etanol 70%	no	no	si	si	2.56
Método Propuesto	si	etanol 70%	si	si (2-ME)	si	si	0.16

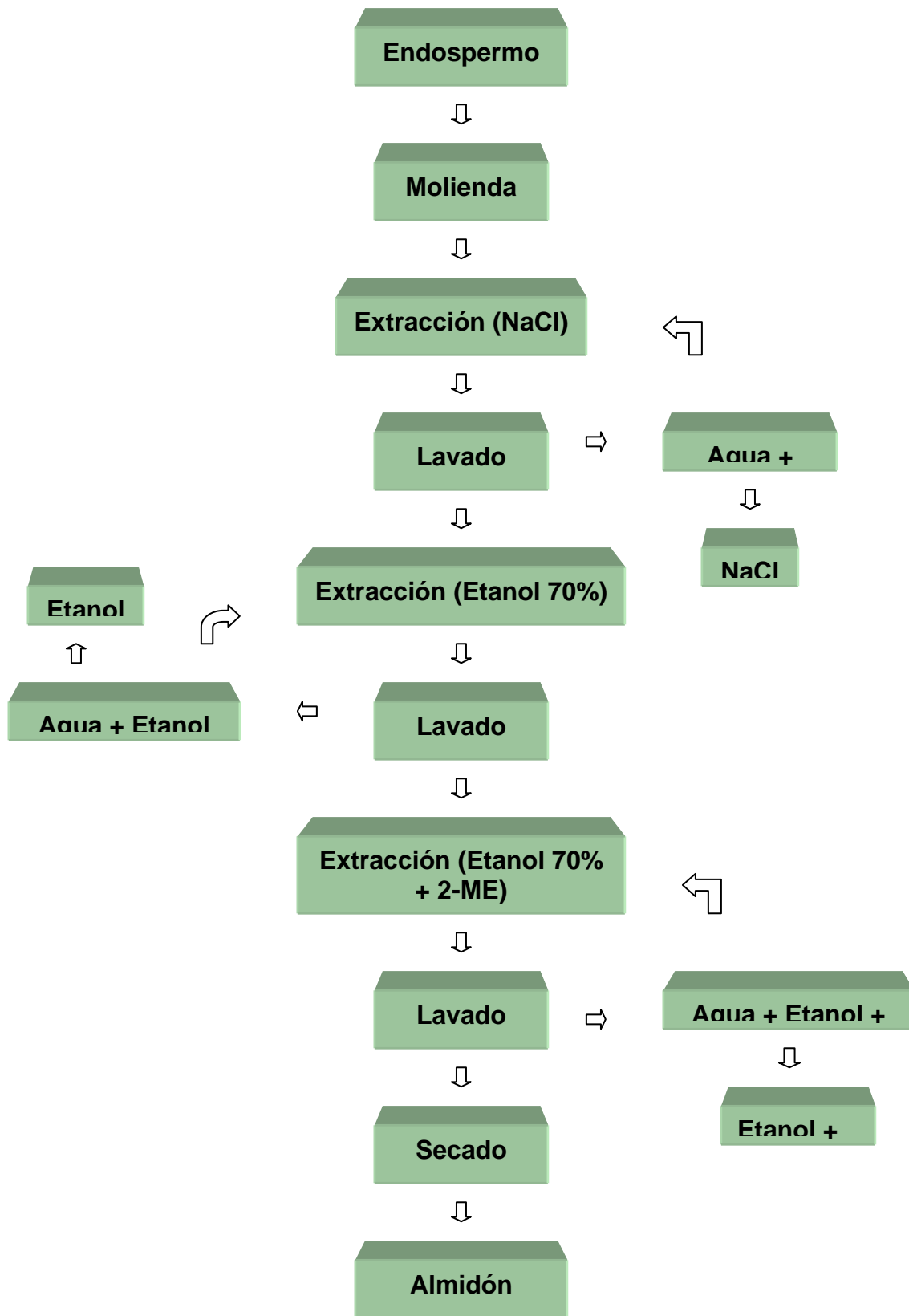


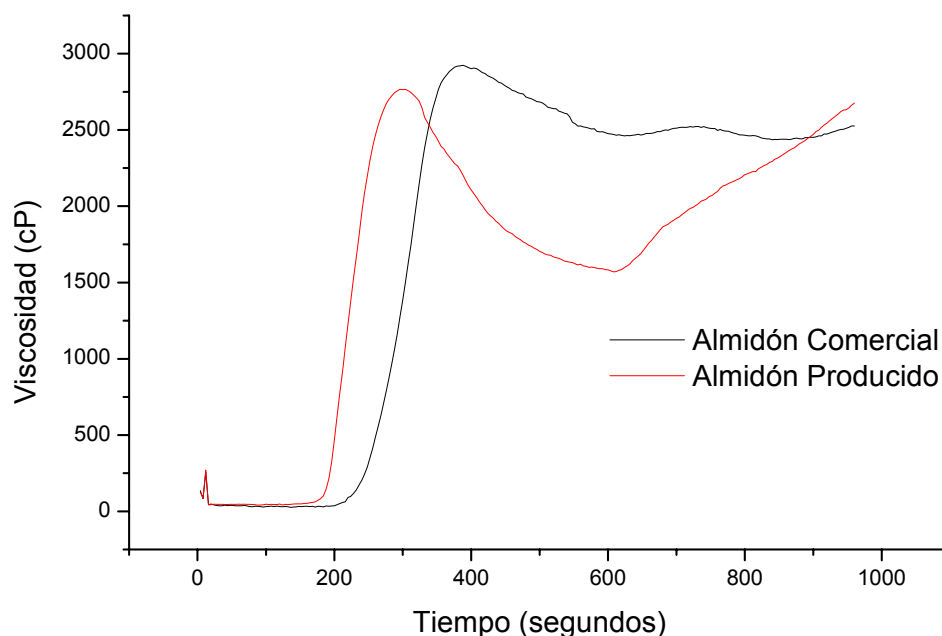
Figura 22. Diagrama de flujo de la extracción de proteínas del almidón de maíz.

6.7 Caracterización del Almidón

6.7.1 Determinación de viscosidad

Los viscoamilogramas de la figura 23, evalúan el comportamiento de la viscosidad del almidón producido y de la muestra control al ser sometidos a un tratamiento térmico. El gráfico obtenido permite evaluar la viscosidad máxima a 90°C durante el calentamiento en el ciclo de temperatura constante a 90°C y la viscosidad a 50°C durante el ciclo de enfriamiento (retrogradación del almidón).

La viscosidad máxima alcanzada fue de 2766 cP para la muestra producida y 2924 cP para la muestra control. La viscosidad mínima fue de 1570 cP y 2461 cP respectivamente. La diferencia entre los valores de viscosidad lo podemos atribuir al porcentaje de almidón dañado presente en las muestras analizadas (10.02% para la muestra obtenida por el proceso y 2.73%, para la muestra control). El daño provocado al almidón influye directamente en la absorción de agua y en la capacidad de retención que pueda tener en un proceso de calentamiento. Por lo tanto, un almidón dañado presenta valores de viscosidad máxima menor debido probablemente a las rupturas estructurales de los gránulos de almidón lo que no permite mantener estable la molécula cuando es sometida a tratamientos térmicos. La inestabilidad de la molécula de almidón provoca que al mantener la temperatura de tratamiento constante a la cual se obtuvo el valor máximo (90°C), el gránulo de almidón pierda agua y por lo tanto no es estable bajo estas condiciones y la viscosidad presenta una caída conforme avanza el tiempo. De forma general se indicaría que mantiene el mismo comportamiento del perfil de viscosidad.



6.7.2 Almidón Dañado

Se calculo según el método desarrollado por Boyaci, 2004. Los resultados se expresan en el cuadro 12.

Cuadro 12. Porcentaje de almidón dañado

Muestra	° Brix	Almidón Dañado (%)
Almidón Producido	3.9	10.02
Almidón Comercial	1.8	2.73

Los porcentajes de almidón dañado de productos comerciales son menores al 10%, sin embargo, el daño que sufre el almidón afecta sus propiedades funcionales y esto se puede aprovechar para dar un uso específico al almidón que se está produciendo. El porcentaje del almidón dañado puede disminuir si se utiliza un molino de discos

después del proceso de descascarado y no el molino de martillos como se realizo en la presente investigación.

Los molinos utilizados en la disminución del tamaño de partícula son de discos y de rodillos para fracciones mas pequeñas, (White, 2003).

6.7.3 Determinación de ISA e IAA

El origen y el proceso de fabricación de los almidones, son factores que influyen de manera directa el valor del ISA e IAA. Evaluar estas propiedades puede ayudar a orientar el uso y las condiciones de proceso en las cuales puede ser usado un almidón. Los valores comparativos de ISA e IAA para las muestras estudiadas se muestran en la siguiente tabla.

Cuadro 13. Valores de ISA e IAA de las muestras estudiadas

Muestra	ISA (%)	IAA (g/g)
Almidón Producido	0.2257	2.5865
Almidón Comercial	0.3147	1.9803

El Índice de Absorción de Agua es mayor para el almidón producido por el método propuesto. Posiblemente el mayor porcentaje de almidón dañado favorece la absorción de agua, considerando que la estructura interna del granulo dañado permite que hayan mas sitios de interacción con el agua disponibles. Según Ranhotra et al, (1993), los gránulos de almidón dañado se hidratan rápidamente y son susceptibles a la hidrólisis enzimática. Un cierto nivel de almidón dañado es deseable por que esto optimiza la hidratación. Sin embargo, un exceso en almidón

dañado puede hidratar demasiado y permitir la aceleración de la actividad enzimática (Ranhotra, et. al; 1993).

El valor del ISA es menor, posiblemente por que en el método de separación de las proteínas se perdió parte de los carbohidratos solubles en agua y es la razón por la cual disminuye el valor de ISA.

VII. CONCLUSIONES

- ❖ El fraccionamiento de las partes anatómicas del grano de maíz por el proceso de descascarado se realizó de forma adecuada, obteniendo un endospermo que permite realizar la extracción de almidón sin contaminación por el pericarpio y el germen.
- ❖ La fracción de endospermo adecuada para el proceso de producción de almidón por molienda seca fue aquella que se obtuvo a 40°C y 20 minutos de acondicionamiento. Considerando que esta muestra contiene el valor mínimo de fibra cruda (0.0518%) y por lo tanto la menor contaminación posible.
- ❖ El molino de bolas disminuye el tamaño de partícula eficientemente, si embargo, no se recomienda para ser usado en la molienda del endospermo para mejorar la separación de las proteínas del almidón por la mayor área superficial de extracción.
- ❖ El daño provocado por el molino de bolas (31.9 – 38.3%) es demasiado elevado considerando que los almidones comerciales no exceden el 2% de almidón dañado. Por lo tanto este método podrá ser utilizado en la industria, para producir almidón resistente, producción de alcohol y almidón modificado.
- ❖ El método propuesto para extraer las proteínas es eficiente y se puede adecuar correctamente a las necesidades de la industria. El uso de ultrasonido y 2-ME dan porcentajes de proteína residual de 0.16%, resultados que mejoran el proceso comercial (0.30% de proteína residual).
- ❖ La viscosidad del almidón producido, presenta un comportamiento característico de los almidones comerciales, con una ligera disminución de su valor de viscosidad máxima.

- ❖ El porcentaje de almidón dañado fue de 10.02%, este valor puede ser aprovechado considerando que afecta favorablemente la propiedad de absorción de agua. Sin embargo, este valor puede disminuir si se utiliza un molino de discos para reducir el tamaño de partícula después del proceso de descascarado.
- ❖ El Índice de Absorción de Agua es mayor para el almidón producido. Posiblemente el mayor porcentaje de almidón dañado favorece la absorción de agua, considerando que la estructura interna del granulo dañado permite que hayan mas sitios de interacción disponibles con el agua.

VIII. RECOMENDACIONES

- ❖ El intervalo de temperatura y tiempo de acondicionamiento debe ser mayor, con el objeto de evaluar con mayor certeza el efecto de estas variables en el proceso de descascarado. Con ello el modelo de regresión para las variables respuesta podría ser usado con mayor confianza.
- ❖ El molino de discos puede ser utilizado para disminuir el tamaño de partícula del endospermo y posiblemente no causaría tanto daño al granulo de almidón como la hace el molino de martillos.
- ❖ El molino de bolas puede ser usado con la finalidad de evaluar el cambio que sufren las propiedades funcionales de los almidones al recibir daño mecánico, pero no con el objeto de producir almidón comercial.
- ❖ El método propuesto para extraer proteínas se puede optimizar y proponer para su uso en la industria, disminuyendo los costos de inversión y bajos consumos de agua.
- ❖ El almidón producido puede ser utilizado en aquellos sistemas alimenticios en los cuales se benefician con una mayor absorción de agua y considerando únicamente sus propiedades funcionales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Badui, D. S. 1993. Química de los Alimentos. Pearson Educación. México D. F.
2. Bonnet, A. 1984. Les déplacements de protéinas par turboseparation. Ind. Cereales 27: 9 – 14.
3. Boyaci, I. H; Williams, P. C. and Koksel, H. 2004. A rapid method for the estimation of damaged starch in wheat flours. Journal of Cereal Science. 39(2004): 139 – 145.
4. Boyer, C. D., and Shannon, J. C. 1983. The use of endosperm genes for sweet corn improvement. Pages 139 – 161 in: Plant Breeding Reviews, Vol. 1. J. Janick, Ed. AVI Publishing Co., Westport, CT.
5. Brekke, O. L. 1965. Corn dry – milling: Effect of temper, time and moisture level on degermination performance. Cereal Chem. 42: 288.
6. Brekke, O. L. 1966. Corn dry – milling: A comparison of several procedures for tempering low – moisture corn. Cereal Chem. 43: 303.
7. Brekke, O. L. 1967. Corn dry – milling: Pretempering low – moisture corn. Cereal Chem. 44: 521.
8. Brekke, O. L. 1968. Corn dry – milling: Stress crack formation in tempering of low – moisture corn, and effect on degerminator performance. Cereal Chem. 45: 291 – 303.
9. Bressani, R; and Mertz, E. T. 1958. Studies on corn proteins. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. Cereal Chem. 35: 227 – 235.

10. Bressani, R. 1971. Amino acid supplementation of cereal grain flours tested in children. En N.S. Schrimshaw y A.M. Altschul, eds. Amino acid fortification of protein foods,, p. 184-204. Cambridge, Mass., EE.UU., MIT Press.
11. Burge, R. M; and Duensing, W. J. 1989. Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World*. 34: 535 – 538.
12. Christianson, D. D; Nielsen, H. C; Khoo, U; Wolf, M. J; and Wall, J. S. 1969. Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix proteins in corn endosperm. *Cereal. Chem.* 46: 372 – 381.
13. Dickey, L. C; Dallmer, M. F; Radewonuk, E. R; Parris, N; Kurantz, M; and Craig, J. C. 1998. Zein batch extraction from dry – milled corn: Cereal disintegration by dissolving fluid shear. *Cereal Chem.* 75(4): 443 – 448.
14. Doublier, J. L. 1999. Rheological properties of cereal carbohydrates in Dough rheology and baked product texture Ed by. Faridi. H.A. y Faubion, J.M., Ed. AVI Book, USA.
15. Duvick, D. N. 1961. Protein granules of maize endosperm cells. *Cereal Chem.* 38: 374 - 385.
16. Earle, F. R. 1977. Protein and oil in corn: Variation by crop years from 1907 to 1972. *Cereal Chem.* 54: 70 – 79.
17. Esen, A. 1986. Separation of alcohol – soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiol.* 80: 623 - 627.
18. Esen, A. 1987. A proposed nomenclature for alcohol – soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays L.*) *J. Cereal Sci.* 5: 117 – 128.

19. Fujii, T., and Tomiyama, S. 1973. Purification of starch by surface active agents. XVII. Removal of crude protein in sweet potato starch by sodium α - olefin sulfonates (AOS). *Eiyo to Shokuryo (Japanese)* 26: 503 – 504.
20. Hamaker, B. R; Mohamed, A. A; Habben, J. E; Huang, C. P. and Larkins, B. A. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chem.* 72(6): 583 – 588.
21. Hansen, D. W. 1949. Manufacture of corn products. U.S. patent 2,472,971.
22. Helle, K. 1988. Jet milling – Super fine grinding technology. *Process and Control Engineering* May: 28 – 30.
23. Hinton, J. J. C. 1953. The distribution of protein in the maize kernel in comparison with that in wheat. *Cereal Chem.* 30: 441 – 445.
24. Hosney, R. C. 1991. *Principios de ciencia y tecnología de los Cereales*. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza (España).
25. Hosney, R. R. 1994. Protein of cereals. Pages 65 – 79 in: *Principles of Cereal Science and Technology*, 2nd ed. Am. Assoc. Cereal Chem; St. Paul, MN.
26. Howe, E.E., Janson, G.R. y Gilfillan, E.W. 1965. Amino acid supplementation of cereal grains as related to the world food supply. *Am. J. Clin. Nutr.* 16: 3 1 5320.
27. Jamin, F. F; and Flores, R. A. 1998. Effect of additional separation and grinding on the chemical and physical properties of selected corn dry - milled streams. *Cereal Chem.* 75(1): 166 - 170.

28. Ji, Y; Seetharaman, K. and White, P. J. 2004. Optimizing a small – scale corn – starch extraction method for use in the laboratory. *Cereal Chem.* 81(1): 55 – 58.
29. Landry, J. and Moureaux, T. 1970. Hétérogénéité des glutelines du grain de maïs: Extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52: 1021 – 1037.
30. Landry, J; Delhaye, S. and Damerval, C. 2000. Improved method for isolating and quantitating α – amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt – soluble protein, zeins, and true glutelins in maize endosperm. *Cereal Chem.* 77(5): 620 – 626.
31. Larkins, B. A. 1981. Seed storage proteins: Characterization and biosynthesis. Pages 449 – 489 in: *Biochemistry of Plants*, Vol. 6. A. Marcus, Ed. Academic Press, N.Y.
32. Lásztity, R. 1996. Maize proteins. Pages 185 – 225 in: *The Chemistry of Cereal Proteins*, 2nd ed. CRC Press, Inc; Boca Raton, FL.
33. Letang, C; Samson, M. F; Lasserre, T. M; Chaurant, M and Abécassis J. 2001. Production of starch with very low protein content from soft and hard wheat flours by jet milling and air classification. *Cereal Chem.* 79(4): 535 – 543.
34. Lin, P. Y.; Czuchajowska, Z. 1996. Starch damage in soft wheats of the Pacific Northwest. *Cereal Chemistry* 73, 551 – 555.
35. Lloyd, N. E; and Mertz, E. T. 1958. Studies on corn proteins. III. The glutelins of corn. *Cereal Chem.* 35: 156 – 168.

36. Mertz, E. T; and Bressani, R. 1957. Studies on corn proteins. I. A new method of extraction. *Cereal Chem.* 34: 63 – 69.
37. Mertz, E. T; Lloyd, N. E; and Bressani, R. 1958. Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts. *Cereal Chem.* 35: 146 – 155.
38. Mistry, A. H; and Eckhoff, S. R. 1992. Dry milling and physical characteristics of alkali – debranned yellow dent corn. *Cereal Chem.* 69(1): 82 – 84.
39. Morgan, J. E., Williams, P. C., 1995. Starch damage in wheat flours: a comparison of enzymatic, iodometric, and near – infrared reflectance techniques. *Cereal Chemistry* 72, 209 – 212.
40. Morrison, W. R; Tester, R. F. and Gidley, M. J. 1994. Properties of damaged starch granules. II. Crystallinity, molecular order and gelatinisation of ball – milled starches. *Journal of Cereal Science.* 19: 209 – 217.
41. Nagy, D; Weidlein, W: and Hixon; R. M. 1941. Factors affecting the solubility of, corn proteins. *Cereal Chem.* 18: 514 – 523.
42. Nowakowski, D; Sosulski, F. W. and Hoover, R. 1986. The effect of pin and attrition milling on starch damage in hard wheat flours. *Starch* 38: 253 – 258.
43. Paulis, J. W. and Wall, J. S. 1969. Albumins and globulins in extracts of corn grain parts. *Cereal Chem.* 46: 263 – 273.
44. Paulis, J. W; and Wall, J. S. 1971. Fraction and properties of alkylated – reduced corn glutelin proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 251: 57 - 69.

45. Paulis, J. W; Bietz, J. A; and Wall, J. S. 1975. Corn protein subunits: Molecular weights determined by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Agr. Food Chem.* 23(2): 197 – 201.
46. Paulis, J. W. 1981. Disulfide structures of zein proteins from corn endosperm. *Cereal Chem.* 58(6): 542 – 546.
47. Piat, M. A. 1984. Utilisation des broyeurs á broches et sélecteurs á air en spirale pour l'enrichissement en protéines des farines. *Ind. Céréales* 27: 15 – 19.
48. Ranhotra, G. S. ; Gelroth, J. A. ; Eisenbraun, G. R. 1993. Correlation between Chopin and AACC Methods of determining damaged starch. *Cereal Chemistry* 70, 235 – 236.
49. Sandstead, H. H; Muñoz, J. M; Jacob, R. A; Klevay, L. M; Reck, S. J; Logan, G. M; Jr; Dintzis, F. R; Inglett; G. E; and Shuey, W. C. 1978. Influence of dietary fiber on trace element balance. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 1497 – 1503.
50. Sodek, L. and Wilson, C. M. 1971. Amino acid composition of proteins isolated from normal, opaque-2 and floury-2 corn endosperms by a modified Osborne procedure, *J. Agric. Food Chem.* 19: 1144 – 1150.
51. Tester, R. F; Morrison, W. R; Gidley, M. J; Kirkland, M and Karkalas, J. 1994. Properties of damaged starch granules. III. Microscopy and particle size analysis of undamaged granules and remnants. *Journal of Cereal Science.* 20: 59 – 67.
52. Thomas, D. J. and Atwell, W. A. 1999. Starch modifications. In: *Starches. Eagan Press Handbook Series.* St. Paul MI. U.S.A. p 31 – 48.

53. Thompson, G. A; and Larkins, B. A. 1989. Structural elements regulating zein gene expression. *Bio Essays* 10: 108 -113.
54. Van Soest, P. J; Fadel, J; and Sniffen, C. J. 1979. Discount factors for energy and protein in ruminant feeds. Pages 63 – 75 in: *Proc. 1979 Cornell Nutrition Conf; Cornell Univ; Ithaca, NY.*
55. Vitale, A; Smaniotto, E; Longhi, R. and Galante, E. 1982. Reduced soluble proteins associated with maize endosperm protein bodies. *J. Exp. Bot.* 33: 439 – 448.
56. Wagner, T. B. 1942. White Goods. U.S. patent 2,248,239.
57. Wallace, J. C; Lopes, M. A; Paiva, E. and Larkins, B. A. 1990. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of γ -zein in modified opaque-2 maize. *Plant physiol.* 92: 191 – 196.
58. Wang, I. and Wang T. J. 2003. Rice starch isolation by neutral protease and high – intensity ultrasound. *Journal of Cereal Science* 39(2003): 291 – 296.
59. Wang, L. and Wang Y. J. 2004. Application of high – intensity ultrasound and surfactants in rice starch isolation. *Cereal Cham.* 81(1): 140 – 144.
60. Watson, S. A. 1987. Structure and composition. Page 76 in: *Corn: Chemistry and Technology*, 1st ed. S. A. Watson and P. E. Ramstad, Eds. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
61. Weber, E. J. 1987. Carotenoids and tocopherols of corn grain determined by HPLC. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 64: 1129 – 1134.

62. Weinecke, L. A. 1962. Corn degermination pre – treatment, U. S. Patent 3,031,305.
63. White, P. J. and Johnson, L. A. 2003. Corn: Chemistry and Technology. Second Edition. American Association of Cereal Chemistry, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
64. Wilson, C. M; 1981. Variations in soluble endosperm proteins of corn (*Zea mays* L.) inbreds as detected by disc gel electrophoresis, *Cereal. Chem.* 58: 401 – 408.
65. Wilson, C. M. 1985. Nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.* 62: 361 – 365.
66. Wilson, C. M. 1987. Proteins of the kernel. Pages 273 – 310 in: *Corn: Chemistry and Technology*, 1st ed. S. A. Watson and P. E. Ramstad, Eds. Am. Assoc. Cereal Chem; St. Paul, MN.
67. Wolf, M. J; Khoo, U; and Seckinger, H. L. 1969. Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high – lysine maize. *Cereal Chem.* 46: 253 – 263.
68. Wu, Y. V; Stringfellow, A. C; and Bietz, J. A. 1990. Relation of wheat hardness to air – classification yields and flour particle size distribution. *Cereal Chem.* 67(5): 421 – 427.
69. Wu, Y. V; and Stringfellow, A. C. 1992. Air classification of flours from wheats with varying Hardness: protein shifts. *Cereal Chem.* 69(2): 188 – 191.

70. Wu, S; Myers, D. J; Johnson, L. A; Fox, S. R. and Singh S. K. 1997. Pilot – plant wet – milling process for producing corn gluten meal. *Cereal Chem.* 74(3): 264 – 267.

X. ANEXOS

Response: Endospermo (%)

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level
A	Temperatura	°C		Numeric	25.00 40.00
B	tiempo (minutos)			Numeric	10.00 30.00

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	9.81	5	1.96	2.03	0.1916
Residual	6.78	7	0.97		
<i>Lack of Fit</i>	3.03	3	1.01	1.08	0.4528
<i>Pure Error</i>	3.75	4	0.94		
Cor Total	16.59	12			

Root MSE	0.98	R-Squared	0.5913
Dep Mean	83.01	Adj R-Squared	0.2993
C.V.	1.19	Pred R-Squared	-1.6139
PRESS	43.37	Adeq Precision	4.371

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	82.50	1	0.44			
A-Temperatura °C	-0.30	1	0.35	-0.85	0.4228	1.00
B-tiempo (minutos)	-2.81	1	1.10	-2.56	0.0377	10.00
A ²	0.61	1	0.37	1.64	0.1446	1.02
B ²	0.22	1	0.37	0.58	0.5823	1.02
B ³	1.65	1	0.70	2.37	0.0496	10.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Endospermo (\%)} &= \\
 &+82.50 \\
 &-0.30 * A \\
 &-2.81 * B \\
 &+0.61 * A^2 \\
 &+0.22 * B^2 \\
 &+1.65 * B^3
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Endospermo (\%)} &= \\
 &+88.58 \\
 &-0.75 * \text{Temperatura } ^\circ\text{C} \\
 &+1.61 * \text{tiempo (minutos)} \\
 &+0.011 * \text{Temperatura } ^\circ\text{C}^2 \\
 &-0.097 * \text{tiempo (minutos)}^2 \\
 &+1.649\text{E-}03 * \text{tiempo (minutos)}^3
 \end{aligned}$$

Diagnostics Case Statistics								
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	84.99	84.78	0.21	0.500	0.295	0.014	0.274	12
2	84.87	84.19	0.68	0.500	0.973	0.158	0.969	1
3	83.64	82.45	1.19	0.500	1.703	0.483	2.060	5
4	81.56	81.86	-0.30	0.500	-0.435	0.031	-0.408	10
5	83.34	84.14	-0.80	0.625	-1.328	0.490	-1.421	11
6	83.22	83.30	-0.082	0.625	-0.137	0.005	-0.127	4
7	81.80	82.24	-0.44	0.875	-1.268	1.876	-1.338	9
8	83.17	83.61	-0.44	0.875	-1.268	1.876	-1.338	13
9	83.08	82.50	0.58	0.200	0.663	0.018	0.634	2
10	81.18	82.50	-1.32	0.200	-1.495	0.093	-1.678	8
11	81.81	82.50	-0.69	0.200	-0.779	0.025	-0.755	7
12	83.52	82.50	1.02	0.200	1.163	0.056	1.199	3
13	82.89	82.50	0.39	0.200	0.448	0.008	0.420	6

Response:	PG (%)	Transform:	Inverse		
Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level
A	Temperatura	°C		Numeric	25.00 40.00
B	tiempo (minutos)			Numeric	10.00 30.00

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	1.281E-04	5	2.563E-05	2.25	0.1598
Residual	7.967E-05	7	1.138E-05		
Lack of Fit	4.085E-05	3	1.362E-05	1.40	0.3644
Pure Error	3.881E-05	4	9.704E-06		
Cor Total	2.078E-04	12			
Root MSE	3.374E-03			R-Squared	0.6166
Dep Mean	0.059			Adj R-Squared	0.3428
C.V.	5.70			Pred R-Squared	-2.0107
PRESS	6.256E-04			Adeq Precision	4.669

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	0.057	1	1.509E-03			
A-Temperatura °C	-1.005E-03	1	1.193E-03	-0.84	0.4273	1.00
B-tiempo (minutos)	-0.010	1	3.772E-03	-2.72	0.0296	10.00
A ²	2.154E-03	1	1.279E-03	1.68	0.1360	1.02
B ²	8.386E-04	1	1.279E-03	0.66	0.5330	1.02
B ³	5.929E-03	1	2.385E-03	2.49	0.0419	10.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 1.0/PG (\%) &= \\
 &+0.057 \\
 &-1.005E-03 * A \\
 &-0.010 * B \\
 &+2.154E-03 * A^2 \\
 &+8.386E-04 * B^2 \\
 &+5.929E-03 * B^3
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 1.0/PG (\%) &= \\
 &+0.079 \\
 &-2.623E-03 * \text{Temperatura } ^\circ\text{C} \\
 &+5.752E-03 * \text{tiempo (minutos)} \\
 &+3.830E-05 * \text{Temperatura } ^\circ\text{C}^2 \\
 &-3.473E-04 * \text{tiempo (minutos)}^2 \\
 &+5.929E-06 * \text{tiempo (minutos)}^3
 \end{aligned}$$

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	0.067	0.066	1.023E-03	0.500	0.429	0.031	0.402	12
2	0.066	0.064	2.504E-03	0.500	1.050	0.184	1.059	1
3	0.061	0.057	4.210E-03	0.500	1.765	0.519	2.193	5
4	0.054	0.055	-6.830E-04	0.500	-0.286	0.014	-0.267	10
5	0.060	0.063	-2.970E-03	0.625	-1.438	0.574	-1.585	11
6	0.060	0.060	-5.570E-04	0.625	-0.270	0.020	-0.251	4
7	0.055	0.057	-1.763E-03	0.875	-1.478	2.550	-1.650	9
8	0.059	0.061	-1.763E-03	0.875	-1.478	2.550	-1.650	13
9	0.059	0.057	1.836E-03	0.200	0.609	0.015	0.579	2
10	0.053	0.057	-4.137E-03	0.200	-1.371	0.078	-1.484	8
11	0.055	0.057	-2.295E-03	0.200	-0.761	0.024	-0.735	7
12	0.061	0.057	3.416E-03	0.200	1.132	0.053	1.160	3
13	0.058	0.057	1.179E-03	0.200	0.391	0.006	0.366	6

Response: Retención 60 mesh

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level	
A	Humedad % (p/p)			Numeric	6.00	10.00
B	Tiempo (H)		Numeric	2.00	3.00	

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	544.42	5	108.88	25.05	0.0002
Residual	30.42	7	4.35		
Lack of Fit	22.74	3	7.58	3.95	0.1089
Pure Error	7.68	4	1.92		

Cor Total 574.85 12

Root MSE	2.08	R-Squared	0.9471
Dep Mean	41.45	Adj R-Squared	0.9093
C.V.	5.03	Pred R-Squared	0.6978
PRESS	173.71	Adeq Precision	15.308

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	42.56	1	0.93			
A-Humedad % (p/p)	7.43	1	0.74	10.08	< 0.0001	1.00
B-Tiempo (H)	-2.57	1	0.74	-3.49	0.0101	1.00
A ²	-2.27	1	0.79	-2.88	0.0238	1.02
B ²	0.47	1	0.79	0.60	0.5678	1.02
AB	1.57	1	1.04	1.51	0.1751	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención 60 mesh} &= \\
 &+42.56 \\
 &+7.43 * A \\
 &-2.57 * B \\
 &-2.27 * A^2 \\
 &+0.47 * B^2 \\
 &+1.57 * A * B
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención 60 mesh} &= \\
 &+32.62 \\
 &+8.88 * \text{Humedad \% (p/p)} \\
 &-27.20 * \text{Tiempo (H)} \\
 &-0.57 * \text{Humedad \% (p/p)}^2 \\
 &+1.89 * \text{Tiempo (H)}^2 \\
 &+1.57 * \text{Humedad \% (p/p)} * \text{Tiempo (H)}
 \end{aligned}$$

Diagnostics Case Statistics									
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Student Residual	Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order	
1	39.78	37.48	2.30	0.625	1.805	0.905	2.286	10	
2	50.22	49.19	1.03	0.625	0.809	0.182	0.786	8	
3	31.27	29.19	2.08	0.625	1.631	0.739	1.919	13	
4	48.00	47.19	0.81	0.625	0.635	0.112	0.606	2	

5	25.05	27.51	-2.46	0.625	-1.925	1.029	-2.597	3
6	47.86	48.52	-0.66	0.625	-0.515	0.074	-0.487	11
7	45.43	47.14	-1.71	0.625	-1.343	0.501	-1.443	7
8	38.47	39.87	-1.40	0.625	-1.097	0.334	-1.116	12
9	44.56	42.56	2.00	0.200	1.073	0.048	1.086	1
10	43.47	42.56	0.91	0.200	0.488	0.010	0.460	6
11	41.52	42.56	-1.04	0.200	-0.558	0.013	-0.528	9
12	41.73	42.56	-0.83	0.200	-0.445	0.008	-0.418	5
13	41.52	42.56	-1.04	0.200	-0.558	0.013	-0.528	4

Response: Retención 80 mesh

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level		
A	Humedad % (p/p)			Numeric		6.00	10.00
B	Tiempo (H)		Numeric	2.00		3.00	

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	4.85	4	1.21	3.81	0.0510
Residual	2.55	8	0.32		
<i>Lack of Fit</i>	2.42	4	0.60	18.81	0.0074
<i>Pure Error</i>	0.13	4	0.032		
Cor Total	7.40	12			

Root MSE	0.56	R-Squared	0.6555
Dep Mean	4.23	Adj R-Squared	0.4833
C.V.	13.33	Pred R-Squared	-1.6910
PRESS	19.90	Adeq Precision	6.935

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	4.23	1	0.16			
A-Humedad % (p/p)	0.61	1	0.20	3.05	0.0158	1.00
B-Tiempo (H)	0.73	1	0.63	1.15	0.2834	10.00
AB	0.61	1	0.28	2.14	0.0644	1.00
B ³	-0.44	1	0.40	-1.10	0.3017	10.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención 80 mesh} &= \\
 &+4.23 \\
 &+0.61 * A \\
 &+0.73 * B \\
 &+0.61 * A * B \\
 &-0.44 * B^3
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Not available, because this model is not hierarchical.

Only hierarchical models are scale independent and can be translated into actual units.

Diagnostics Case Statistics								
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Student Residual	Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	3.40	3.95	-0.55	0.702	-1.773	1.480	-2.128	10
2	3.33	3.95	-0.62	0.702	-2.022	1.926	-2.706	8
3	2.76	3.31	-0.55	0.702	-1.773	1.480	-2.128	13
4	5.11	5.73	-0.62	0.702	-2.022	1.926	-2.706	2
5	3.78	3.37	0.41	0.327	0.877	0.075	0.863	3
6	5.61	5.10	0.51	0.327	1.112	0.120	1.131	11
7	5.00	4.45	0.55	0.577	1.486	0.602	1.633	7
8	4.56	4.01	0.55	0.577	1.486	0.602	1.633	12
9	4.34	4.23	0.11	0.077	0.194	0.001	0.182	1
10	4.13	4.23	-0.10	0.077	-0.193	0.001	-0.181	6
11	4.13	4.23	-0.10	0.077	-0.193	0.001	-0.181	9
12	4.56	4.23	0.33	0.077	0.600	0.006	0.574	5
13	4.34	4.23	0.11	0.077	0.194	0.001	0.182	4

Response: Retención 100 mesh

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level		
A	Humedad % (p/p)			Numeric		6.00	10.00
B	Tiempo (H)		Numeric	2.00		3.00	

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	4.16	6	0.69	10.96	0.0051
Residual	0.38	6	0.063		
<i>Lack of Fit</i>	<i>0.14</i>	<i>2</i>	<i>0.069</i>	<i>1.14</i>	<i>0.4061</i>
<i>Pure Error</i>	<i>0.24</i>	<i>4</i>	<i>0.061</i>		
Cor Total	4.54	12			

Root MSE	0.25	R-Squared	0.9164
Dep Mean	1.91	Adj R-Squared	0.8328
C.V.	13.20	Pred R-Squared	-0.1617
PRESS	5.28	Adeq Precision	9.355

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	1.60	1	0.11			
A-Humedad % (p/p)	1.27	1	0.28	4.51	0.0040	10.00
B-Tiempo (H)	-0.46	1	0.28	-1.65	0.1508	10.00
A ²	0.057	1	0.095	0.60	0.5696	1.02
B ²	0.43	1	0.095	4.56	0.0039	1.02
A ³	-0.57	1	0.18	-3.23	0.0179	10.00
B ³	0.46	1	0.18	2.60	0.0405	10.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención 100 mesh} &= \\
 &+1.60 \\
 &+1.27 * A \\
 &-0.46 * B \\
 &+0.057 * A^2 \\
 &+0.43 * B^2 \\
 &-0.57 * A^3 \\
 &+0.46 * B^3
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención 100 mesh} &= \\
 &-10.48 \\
 &-13.39 * \text{Humedad \% (p/p)} \\
 &+59.85 * \text{Tiempo (H)} \\
 &+1.74 * \text{Humedad \% (p/p)}^2 \\
 &-26.05 * \text{Tiempo (H)}^2 \\
 &-0.072 * \text{Humedad \% (p/p)}^3 \\
 &+3.71 * \text{Tiempo (H)}^3
 \end{aligned}$$

Diagnostics Case Statistics								
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Student Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	1.27	1.40	-0.13	0.625	-0.852	0.173	-0.829	10
2	2.66	2.79	-0.13	0.625	-0.852	0.173	-0.829	8
3	1.27	1.40	-0.13	0.625	-0.852	0.173	-0.829	13
4	2.66	2.79	-0.13	0.625	-0.852	0.173	-0.829	2
5	1.68	1.55	0.13	0.875	1.475	2.176	1.687	3
6	2.02	1.89	0.13	0.875	1.475	2.176	1.687	11
7	1.95	1.82	0.13	0.875	1.475	2.176	1.687	7
8	3.26	3.13	0.13	0.875	1.475	2.176	1.687	12
9	1.52	1.60	-0.084	0.200	-0.373	0.005	-0.345	1
10	1.52	1.60	-0.084	0.200	-0.373	0.005	-0.345	6
11	1.95	1.60	0.35	0.200	1.537	0.084	1.803	9
12	1.73	1.60	0.13	0.200	0.560	0.011	0.525	5
13	1.30	1.60	-0.30	0.200	-1.351	0.065	-1.478	4

Response: Retención 200 mesh

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level	
A	Humedad % (p/p)			Numeric	6.00	10.00
B	Tiempo (H)		Numeric	2.00	3.00	

ANOVA for Response Surface Reduced Cubic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	14.42	6	2.40	5.58	0.0276
Residual	2.58	6	0.43		
<i>Lack of Fit</i>	0.79	2	0.39	0.88	0.4834
<i>Pure Error</i>	1.80	4	0.45		
Cor Total	17.00	12			

Root MSE	0.66	R-Squared	0.8481
Dep Mean	3.85	Adj R-Squared	0.6962
C.V.	17.03	Pred R-Squared	-0.5158
PRESS	25.77	Adeq Precision	8.537

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	4.34	1	0.29			
A-Humedad % (p/p)	2.68	1	0.73	3.66	0.0106	10.00
B-Tiempo (H)	-0.043	1	0.73	-0.059	0.9552	10.00
A ²	-0.50	1	0.25	-2.00	0.0924	1.02
B ²	-0.30	1	0.25	-1.21	0.2730	1.02
A ³	-2.07	1	0.46	-4.46	0.0043	10.00
B ³	0.37	1	0.46	0.79	0.4579	10.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención 200 mesh} &= \\
 &+4.34 \\
 &+2.68 * A \\
 &-0.043 * B \\
 &-0.50 * A^2 \\
 &-0.30 * B^2
 \end{aligned}$$

-2.07 * A³
+0.37 * B³

Final Equation in Terms of Actual Factors:

Retención 200 mesh =
+64.72
-46.30 * Humedad % (p/p)
+61.11 * Tiempo (H)
+6.08 * Humedad % (p/p)²
-23.28 * Tiempo (H)²
-0.26 * Humedad % (p/p)³
+2.94 * Tiempo (H)³

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	2.12	2.61	-0.49	0.625	-1.210	0.349	-1.271	10
2	3.77	3.84	-0.066	0.625	-0.165	0.006	-0.151	8
3	3.19	3.26	-0.066	0.625	-0.165	0.006	-0.151	13
4	4.00	4.49	-0.49	0.625	-1.210	0.349	-1.271	2
5	5.68	5.40	0.28	0.875	1.191	1.418	1.244	3
6	1.57	1.29	0.28	0.875	1.191	1.418	1.244	11
7	3.04	2.76	0.28	0.875	1.191	1.418	1.244	7
8	5.00	4.72	0.28	0.875	1.191	1.418	1.244	12
9	5.21	4.34	0.87	0.200	1.476	0.078	1.688	1
10	4.78	4.34	0.44	0.200	0.743	0.020	0.712	6
11	3.47	4.34	-0.87	0.200	-1.489	0.079	-1.713	9
12	4.13	4.34	-0.21	0.200	-0.365	0.005	-0.337	5
13	4.13	4.34	-0.21	0.200	-0.365	0.005	-0.337	4

Response: Retención Fondo

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level	
A	Humedad % (p/p)			Numeric	6.00	10.00

B	Tiempo (H)	Numeric	2.00	3.00
---	------------	---------	------	------

ANOVA for Response Surface Quadratic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	390.88	5	78.18	19.92	0.0005
Residual	27.47	7	3.92		
<i>Lack of Fit</i>	16.18	3	5.39	1.91	0.2691
<i>Pure Error</i>	11.28	4	2.82		
Cor Total	418.34	12			

Root MSE	1.98	R-Squared	0.9343
Dep Mean	57.28	Adj R-Squared	0.8875
C.V.	3.46	Pred R-Squared	0.6828
PRESS	132.70	Adeq Precision	13.744

Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H₀ Coeff=0	Prob > t 	VIF
Intercept	57.21	1	0.89			
A-Humedad % (p/p)	-6.54	1	0.70	-9.34	< 0.0001	1.00
B-Tiempo (H)	1.71	1	0.70	2.44	0.0447	1.00
A ²	1.13	1	0.75	1.51	0.1754	1.02
B ²	-1.02	1	0.75	-1.36	0.2154	1.02
AB	-1.31	1	0.99	-1.32	0.2283	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención Fondo} &= \\
 &+57.21 \\
 &-6.54 * A \\
 &+1.71 * B \\
 &+1.13 * A^2 \\
 &-1.02 * B^2 \\
 &-1.31 * A * B
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 \text{Retención Fondo} &= \\
 &+41.21 \\
 &-4.53 * \text{Humedad \% (p/p)} \\
 &+34.34 * \text{Tiempo (H)} \\
 &+0.28 * \text{Humedad \% (p/p)}^2 \\
 &-4.09 * \text{Tiempo (H)}^2
 \end{aligned}$$

-1.31 * Humedad % (p/p) * Tiempo (H)

Diagnostics Case Statistics								
Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	60.63	60.84	-0.21	0.625	-0.176	0.009	-0.163	10
2	48.00	50.38	-2.38	0.625	-1.963	1.070	-2.710	8
3	68.08	66.88	1.20	0.625	0.992	0.273	0.991	13
4	50.22	51.18	-0.96	0.625	-0.795	0.175	-0.771	2
5	67.78	68.72	-0.94	0.625	-0.778	0.168	-0.754	3
6	52.35	50.23	2.12	0.625	1.749	0.849	2.157	11
7	54.34	52.75	1.59	0.625	1.311	0.478	1.398	7
8	57.17	57.58	-0.41	0.625	-0.341	0.032	-0.318	12
9	55.21	57.21	-2.00	0.200	-1.130	0.053	-1.157	1
10	55.65	57.21	-1.56	0.200	-0.882	0.032	-0.866	6
11	58.91	57.21	1.70	0.200	0.958	0.038	0.952	9
12	57.82	57.21	0.61	0.200	0.343	0.005	0.320	5
13	58.47	57.21	1.26	0.200	0.710	0.021	0.682	4

Response: DS

Factor	Name	Units	Type	-1 Level	+1 Level	
A	Humedad % (p/p)			Numeric	6.00	10.00
B	Tiempo (H)		Numeric	2.00	3.00	

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	61.12	4	15.28	8.44	0.0057
Residual	14.48	8	1.81		
Lack of Fit	2.89	4	0.72	0.25	0.8964

Pure Error 11.59 4 2.90
 Cor Total 75.61 12

Root MSE 1.35 R-Squared 0.8084
 Dep Mean 34.97 Adj R-Squared 0.7126
 C.V. 3.85 Pred R-Squared 0.5818
 PRESS 31.61 Adeq Precision 9.229
 Desire > 4

Factor	Coefficient Estimate	DF	Standard Error	t for H ₀ Coeff=0	Prob > t	VIF
Intercept	34.62	1	0.60			
A-Humedad % (p/p)	2.15	1	0.48	4.53	0.0019	1.00
B-Tiempo (H)	1.70	1	0.48	3.57	0.0073	1.00
A ²	0.28	1	0.51	0.55	0.5949	1.02
B ²	0.28	1	0.51	0.55	0.5949	1.02

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 DS &= \\
 &+34.62 \\
 &+2.15 * A \\
 &+1.70 * B \\
 &+0.28 * A^2 \\
 &+0.28 * B^2
 \end{aligned}$$

Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$\begin{aligned}
 DS &= \\
 &+29.10 \\
 &-0.054 * Humedad \% (p/p) \\
 &-2.25 * Tiempo (H) \\
 &+0.071 * Humedad \% (p/p)^2 \\
 &+1.13 * Tiempo (H)^2
 \end{aligned}$$

Diagnostics Case Statistics

Standard Order	Actual Value	Predicted Value	Student Residual	Student Leverage	Cook's Residual	Outlier Distance	Run t	Order
1	31.88	31.33	0.55	0.375	0.513	0.032	0.488	10
2	36.44	35.64	0.80	0.375	0.752	0.068	0.730	8
3	34.62	34.73	-0.11	0.375	-0.103	0.001	-0.097	13
4	38.26	39.04	-0.78	0.375	-0.729	0.064	-0.706	2
5	31.88	32.14	-0.26	0.625	-0.316	0.033	-0.298	3
6	38.26	38.23	0.030	0.625	0.037	0.000	0.035	11

7	31.88	32.78	-0.90	0.625	-1.097	0.401	-1.113	7
8	38.26	37.59	0.67	0.625	0.818	0.223	0.799	12
9	35.53	34.62	0.91	0.200	0.756	0.029	0.734	1
10	36.44	34.62	1.82	0.200	1.512	0.114	1.674	6
11	32.80	34.62	-1.82	0.200	-1.512	0.114	-1.674	9
12	32.80	34.62	-1.82	0.200	-1.512	0.114	-1.674	5
13	35.53	34.62	0.91	0.200	0.756	0.029	0.734	4