

00562.

11

19

CAMBIOS EN LAS PROTEINAS DEL MAIZ DURANTE LA

NIXTAMALIZACION

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)

PRESENTA

MARIA DIANA SANCHEZ MEJORADA MARTINEZ DEL SOBRAL

OCTUBRE 1982

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INTRODUCCION

ANTECEDENTES HISTORICOS

FORMA DE CONSUMO DEL MAIZ

TRATAMIENTO ALCALINO

USO DE ALCALI EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS

EFFECTO DEL ALCALI SOBRE LAS PROTEINAS

a) Desnaturalización

b) Hidrólisis

EFFECTO DEL ALCALI SOBRE LOS AMINOACIDOS

a) Hidrólisis

b) Racemización

c) β -Eliminación y Formación de Dehidroalanina

d) Reacción de Adición y Formación de Nuevos Aminoácidos

LISINOALANINA

a) Mecanismo de Formación de LAL

b) Ocurrencia de Lisinoalanina

c) Efectos Biológicos de la Lisinoalanina

JUSTIFICACION DEL TRABAJO

OBJETIVOS

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

PROCESO DE NIXTAMALIZACION

PREPARACION DE LA HARINA

ANALISIS BROMATOLOGICO GENERAL

- a) Humedad
- b) Extracto Etéreo
- c) Nitrógeno

EXTRACCION DE PROTEINAS

METODO DE HANSEL

- a) Extracción de Albúminas
- b) Extracción de Globulinas
- c) Extracción de Prolaminas
- d) Extracción de Glutelinas

METODO DE PAULIS

- a) Extracción de Albúminas
- b) Extracción de Globulinas
- c) Extracción de Prolaminas
- d) Extracción de Glutelinas

ANALISIS DE PROTEINAS

ANALISIS CUANTITATIVO

- a) Método de Lowry
- b) Método de Microkjeldahl

ANALISIS CUALITATIVO

- a) Geles de Acrilamida al 10%
- b) Geles de Gradiente de Acrilamida

ANALISIS DE AMINOACIDOS

- a) Hidrólisis ácida

b) Hidrólisis alcalina

c) Cromatografía en capa fina

PRUEBAS BIOLÓGICAS

a) Animales y Especificaciones

b) Preparación de Dietas

RESULTADOS

NIXTAMALIZACIÓN

ANÁLISIS BROMATOLÓGICO GENERAL

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

ANÁLISIS CUANTITATIVO

ANÁLISIS CUALITATIVO

ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

PRUEBAS BIOLÓGICAS

DISCUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA

INTRODUCCION

*"... de maíz amarillo y de maíz blanco, se hizo su carne, de masa de maíz se hicieron los brazos y las piernas y moliendo entonces las mazorcas amarillas y las mazorcas blancas, hizo Ixmucané nueve bebidas y de este alimento provi-
nieron la fuerza y la gordura y con él crearon los músculos y el vigor del hombre". (Popol Vuh).*

ANTECEDENTES HISTORICOS.

En los últimos 10,000 años han ocurrido tres grandes revoluciones en la agricultura, cada una de las cuales ha estado asociada a la aparición de un cultivo particular. El trigo fue domesticado primeramente en el Medio Oriente; más tarde, el arroz en Asia y el maíz en el Hemisferio Occidental. Estos cambios, que marcan el comienzo de una dependencia en las cosechas de cereales, han tenido un profundo efecto en el curso evolutivo del hombre moderno; entre otras cosas se han provocado grandes cambios en las dietas y un rápido aumento en el tamaño de la población, acompañados de grandes modificaciones en la organización social y cultural de los pueblos y el asentamiento de los fundamentos del

desarrollo de la tecnología. Estos cambios están consecuentemente asociados tanto a la evolución biológica como a la evolución cultural del hombre moderno.

Aunque antes de 1492 el maíz era una planta desconocida en el Viejo Mundo, en la América Precolombina era una de las plantas básicas en la alimentación de todas las culturas y civilizaciones avanzadas, incluyendo a los Incas en América del Sur y a los Mayas y Aztecas en Mesoamérica. Los restos prehistóricos más antiguos que se conocen son aquéllos encontrados por Mangelsdorf y colaboradores (1964) en el Valle de Tehuacán, en México, cuya edad, calculada por medio de isótopos de carbono, se ha determinado entre 5200 y 3600 A.C.

Originario de Mesoamérica, la presencia del maíz ha sido tan señalada que los historiadores han identificado a las civilizaciones que aquí florecieron como "Culturas del Maíz". En el Popol Vuh, uno de los más valiosos ejemplos de la literatura indígena primitiva de América, se habla ampliamente del papel que el citado cereal jugó en la creación del hombre. En relatos de la cultura náhuatl se refiere como Quetzalcóatl enseñó a los hombres el cultivo del maíz y en los pertenecientes a la cultura azteca,

se describe como la vida giraba en torno a la milpa o maizal. En la milpa se cultivaban frijoles empleando los tallos de maíz para soporte y además chilacayotes, calabazas y ayocote plantados en medio de las milpas; los aztecas nunca tuvieron otro alimento básico que el maíz.

El maíz hizo posible en México la vida sedentaria. Ya que el pueblo mexicano sólo tenía ese grano, es comprensible la participación tan grande que tuvo en el ritual y en la práctica; después, durante la Reforma, el Porfiriato y la Revolución, el maíz siguió siendo el sustento fundamental del pueblo mexicano.

A través de los siglos, el cultivo del maíz se ha vuelto prácticamente obligatorio; en tiempos modernos este grano ha sido hibridizado para producir variedades con un mayor valor nutritivo y mejor rendimiento en el campo de la agricultura.

El maíz tiene una enorme capacidad adaptativa; crece de los 58° de latitud norte en Rusia y Canadá, hasta los 40° de latitud sur en Australia. Igualmente se desarrolla en los Valles del Caspio, bajo el nivel del mar, hasta los Andes Peruanos a una altura de 3660 m. Se cultiva en áreas con una precipitación pluvial anual de 25 cm, así como en regiones donde la precipitación pluvial alcanza hasta 508 cm. Crece tanto en lugares de veranos

cortos como en aquéllos que presentan climas tropicales.

FORMA DE CONSUMO DEL MAIZ.

La forma de consumo del maíz varía de región a región. A continuación se describen algunas técnicas utilizadas en varios países para su preparación.

La arepa (de erepa que en el dialecto caribe cumanagoto, era el nombre genérico del maíz) es el plato típico de la dieta del venezolano y se consume generalmente en el medio rural con alimentos de escaso valor proteínico (Rodríguez, 1972). Este pan amasado con agua y sal en forma de disco redondo y cocido al horno, está hecho de masa de maíz pilado (degerminado).

También en Colombia, alrededor de una tercera parte del maíz ingerido diariamente por persona (52.6 g), lo es en forma de arepa (Pradilla *et al*, 1972).

En Africa, el grano de maíz es normalmente procesado en forma de harina y convertido en una sopilla espesa, o utilizado para manufacturar una especie de pan. El método que se emplee en la preparación determina el tipo y la calidad nutritiva de la harina producida (Lungu, 1972).

En Malawi y países vecinos, la harina de maíz se prepara tradicionalmente por un proceso húmedo: El grano se remoja ligeramente rociando agua sobre él. El pericarpio y el germen se separan golpeando el maíz en un mortero de madera. El pericarpio y el germen son apartados por una corriente de aire, y el endospermo pulido se remoja en agua por un período de 3 a 9 días, y después se limpia y se muele para convertirlo en harina (Lungu, 1972).

Es interesante notar que de los pueblos que consumían maíz como alimento principal, los más sobresalientes y desarrollados fueron, en su gran mayoría, aquéllos que le dieron un tratamiento alcalino antes de su consumo; este álcali se obtenía al hervir el maíz en agua con cal, cenizas de madera o lejía (Katz *et al.*, 1974).

Es posible que en muchas de las antiguas culturas usaran el álcali con el único fin de ablandar e hinchar el grano de maíz y tener así menos dificultad en la molienda; sin embargo, algunas tenían la creencia de que daba mejores resultados en el proceso digestivo. Así, los Tarascos molían el maíz en el metate con bicarbonato para prevenir la constipación; los aborígenes de Delaware usaban la masa como alimento apropiado para los enfermos; pensaban que las cenizas en las cuales cocinaban sus alimentos te

nían la misma función que la arena para los pájaros: limpiar sus estómagos.

El uso de cal en el maíz está restringido a Mesoamérica, al Suroeste de Estados Unidos, y algunas regiones de Africa. La forma como se consume el maíz es muy variada y en muchos casos se siguen todavía las técnicas tradicionales usadas desde hace muchos siglos. En México, por ejemplo, el maíz se consume principalmente en forma de tortillas; éstas se preparan con un método conocido con el nombre de nixtamalización, proveniente del Náhuatl: "Nextli" que significa cenizas o cenizas de cal y "tamalli", harina de maíz. El maíz se hierve en agua con una relación de 1:3 (peso:volumen) con una cantidad de 1 a 2 gramos de cal por 100 gramos de maíz, dependiendo de la dureza del grano y se deja reposar de 8 a 14 horas. El agua de reposo (nejayote) se desecha. Los granos se lavan con agua y se muelen en las piedras de nixtamal para obtener la masa. Esta masa se moldea para darle forma de tortilla, la cual se cuece sobre el comal durante un tiempo que varía de 3 a 5 minutos a una temperatura de 180°C. Con esta masa se pueden hacer también tamales, atole, etc. Este proceso se ha llevado a cabo desde hace muchos siglos. Clavijero lo relata en su Historia Antigua de México:

"... con El (el maíz), hacían pan, enteramente diverso del de Europa, no menor en el sabor y en la figura, que en el modo que tenían de hacerlo, y que aún conservan hasta ahora. Cuecen el grano en el agua con un poco de cal: cuando empieza a ponerlo blando lo aprietan entre las manos, para quitarle la piel; después lo revuelven en el metatl, toman un poco de masa y extendiéndola entre ambas manos, forman pan, que cuecen últimamente en el comalli".

TRATAMIENTO ALCALINO.

USO DE ALCALI EN LA PREPARACION DE ALIMENTOS.

El tratamiento alcalino no sólo fue utilizado por las culturas prehispánicas en la preparación de alimentos a base de maíz. En la actualidad el uso de álcali está firmemente establecido en la moderna tecnología de alimentos y existe una gran cantidad de procesos que la utilizan. Entre otros, se puede mencionar la manufactura de aislados y concentrados proteínicos, la producción de proteínas utilizadas como emulsificantes y antiespumantes, la preparación de análogos de alimentos comunes, particularmente carnes, la elaboración de proteína texturizada y el escaldado de frutas y vegetales (O'Donovan, 1976; Van Beek *et al*,

1974; Finley *et al.*, 1978; Provansal *et al.*, 1975; Shemer *et al.*, 1978).

La cal, en particular, es ampliamente utilizada en la industria alimenticia. Se emplea en la industria lechera en la producción de mantequilla, de caseinato y de lactato de calcio. En la industria azucarera se utiliza para remover fosfatos y ácidos orgánicos indeseables. A partir de huesos y piel de desperdicio de rastros tratados con cal se producen gelatinas. El almacenamiento de frutas y vegetales en atmósferas controladas requiere de cal para mantener una relación alta de O_2/CO_2 . Se utiliza cal para la obtención de tartrato de calcio a partir de desperdicios de la industria vitivinícola y la preparación de fosfato monocálcico para elaborar polvo de hornear se lleva a cabo con altas cantidades de cal (National Lime Association, 1973).

En las sociedades industrializadas existe una gran preferencia por los alimentos manufacturados, lo que ha obligado a que se considere la necesidad de determinar el efecto del procesamiento en el valor nutritivo de varios alimentos. El álcali es una de las sustancias que se encuentran bajo la lista GRAS (generalmente reconocido como seguro) (Nashef *et al.*, 1977). Sin embargo se ha observado que tanto el calentamiento como el tratamiento alcalino afectan adversamente el valor nutritivo de las proteínas

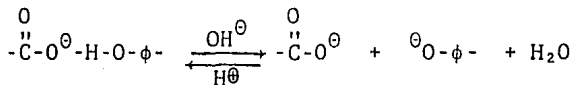
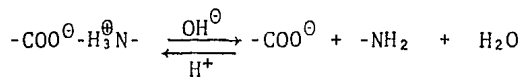
(Sternberg *et al*, 1975b; de Groot y Slump, 1969a).

EFFECTO DEL ALCALI SOBRE LAS PROTEINAS.

Se tiene evidencia de que las proteínas sufren reacciones de desnaturalización e hidrólisis cuando son sometidas a un tratamiento alcalino.

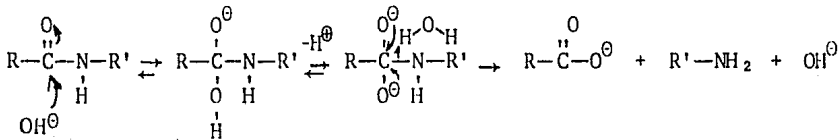
a) Desnaturalización.

Las proteínas son muy susceptibles a la desnaturalización en solución alcalina causada por una disminución en la estabilidad de la estructura terciaria debido a la eliminación de interacciones electrostáticas entre grupos carboxilo y amino y de los puentes de hidrógeno formados entre el grupo hidroxilo de la tirosina y grupos carboxilo.



b) Hidrólisis.

Una de las reacciones de hidrólisis más comunes que se lleva a cabo en las proteínas que se encuentran bajo condiciones alcalinas, es la de hidrólisis del enlace peptídico la cual consiste en el ataque del ión hidroxilo al grupo carbonilo de la amida, provocándose así la ruptura de la proteína.



Generalmente las reacciones de desnaturalización e hidrólisis provocadas por el tratamiento no causan efectos nocivos en cuanto a nutrición. Sin embargo, sus aminoácidos pueden sufrir modificaciones causando una disminución en el valor biológico de las proteínas.

EFFECTO DEL ALCALI SOBRE LOS AMINOACIDOS.

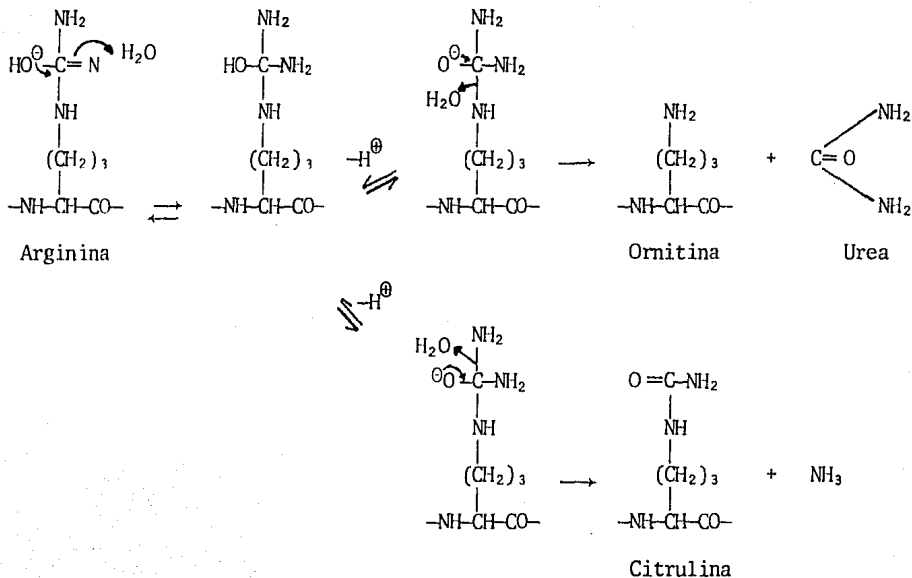
Los aminoácidos de las proteínas sometidas a tratamiento alcalino pueden sufrir modificaciones por medio de hidrólisis, racemización y β -eliminación. Los aminoácidos modificados también pueden dar lugar a nuevos aminoácidos por medio de las reac-

ciones de adición que se llevan a cabo en soluciones alcalinas.

a) Hidrólisis.

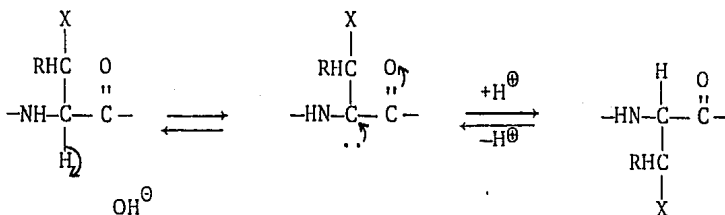
Entre los aminoácidos que se hidrolizan por efecto del pH alto, se encuentran la glutamina y la asparagina, los cuales por medio de una reacción de desaminación, producen ácido glutámico y ácido aspártico respectivamente.

Por otro lado, la arginina también puede hidrolizarse dando lugar a ornitina y citrulina.



b) Racemización.

También se llevan a cabo reacciones de racemización en los aminoácidos sometidos a tratamiento alcalino. Al carbanión formado inicialmente, se le adiciona un hidrógeno, dando como resultado el residuo D o L del aminoácido de acuerdo a la siguiente reacción:

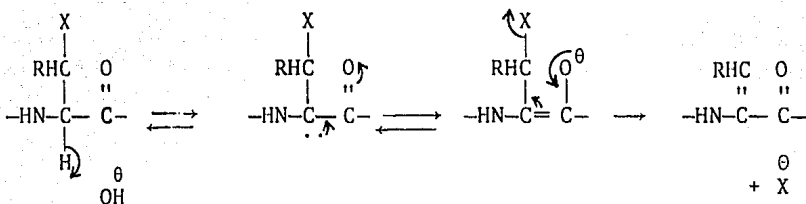


Residuo L-Amino Acil

Residuo D-Amino Acil

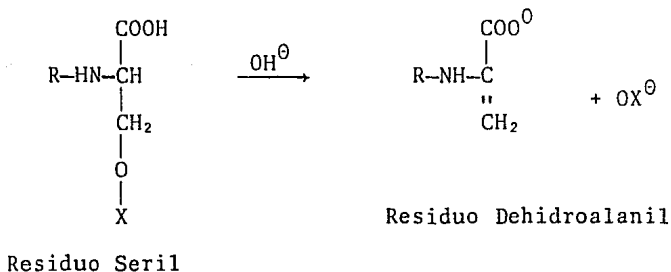
c) β -Eliminación y Formación de Dehidroalanina.

Las reacciones de β -eliminación se inician bajo condiciones alcalinas, de la misma forma que la racemización. Estas reacciones son dependientes de: pH, temperatura y presencia de otros iones (Nashef *et al*, 1977; Sternberg *et al*, 1975b; Whitaker, 1980).

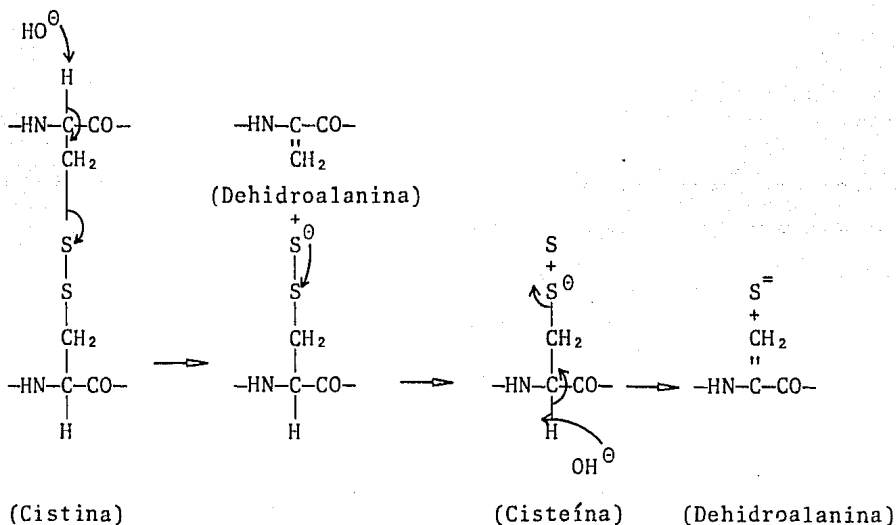


Los aminoácidos que contienen grupos funcionales en el átomo de carbono β son precursores potenciales de dehidroalanina por medio de una β-eliminación. Existe pérdida de los aminoácidos cistina, cisteína, serina, treonina, lisina y arginina debido a este tipo de reacciones y transformándose en el dehidroaminoácido.

La serina, un aminoácido β-sustituído, puede dar como resultado, bajo tratamiento alcalino, dehidroalanina (Gross, 1977):



También la cisteína y la cistina, dos aminoácidos en los cuales en la posición de sustitución se encuentra el azufre en forma de grupo sulfhidrilo y disulfuro, son posibles precursores de dehidroalanina (Asquith y Carthew, 1972).



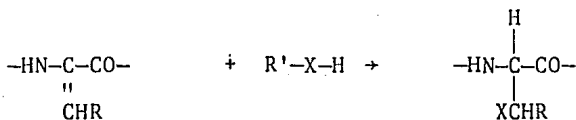
La β -eliminación bimolecular del grupo disulfuro es iniciada por la eliminación de un hidrógeno del carbono α por medio de un ataque del ión hidróxido, seguido de la liberación de un residuo de S-tiocisteína. Este último es inestable y se descompone rápidamente a cisteína y azufre libre (Spande *et al*, 1970; Gross, 1977). La cisteína a su vez puede dar lugar a otra molécula de

dehidroalanina.

d) Reacción de Adición y Formación de Nuevos Aminoácidos.

La doble ligadura de dehidroalanina (o del dehidroaminoácido) formadas por la reacción de β -eliminación es muy reactiva con nucleófilos en solución. Estos pueden ser nucleófilos adicionados, como sulfito, sulfuro, cisteína y otros compuestos con sulfhidrilos; aminas como α -N-acetil-lisina o amoniaco; o los nucleófilos pueden ser proporcionados por las cadenas laterales de residuos de aminoácidos como lisina, cisteína, histidina o triptofano de la misma proteína que se encuentra reaccionando en la solución alcalina.

La adición de la doble ligadura de dehidroalanina (o β -metildehidroalanina) involucra un ataque nucleofílico, por compuestos que contienen S, O ó NH, de acuerdo a la siguiente reacción:



donde:

R = H o CH₃

R' = Proteína, el residuo de la cadena lateral de un aminoácido (puede contener S, O ó NH) ó H.

La dehidroalanina puede, por lo tanto, reaccionar con el grupo ξ amino de lisina, el grupo δ amino de ornitina, el grupo imidazol de histidina y el grupo guanidino de arginina dando como resultado la formación de un gran número de "nuevos" aminoácidos de los cuales solo algunos son constituyentes naturales de proteínas (Finley y Friedman, 1977).

El péptido nisina, presente en *Streptococcus lactis*, contiene dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina y β -metil-lantionina (Gross y Morell, 1971).

Desde 1936, Speakman y Whewell postularon la formación de la lantionina como producto de descomposición de la cisteína en lana tratada con álcali. La presencia de este nuevo aminoácido fue confirmada al ser aislado por Horn y colaboradores en 1940. Se le dió el nombre de lantionina debido a que había sido aislada de la lana y contiene azufre.

Después empezaron a sugerirse muchos otros productos de degradación, pero todos se descomponían con la hidrólisis ácida, y por lo tanto su presencia no podía probarse por aislamiento (Asquith *et al*, 1969).

Zeigler y colaboradores (1967) obtuvieron el nuevo ami-

noácido ornitinoalanina a partir de la seda. La ornitinoalanina proviene generalmente de ornitina y ésta a su vez de la descomposición del grupo guanidino de arginina.

LISINOALANINA.

a) Mecanismo de Formación de LAL.

En 1964 Bohak encontró un nuevo aminoácido en ribonucleasa A que había sido almacenada a pH 13. Simultáneamente Patchornik y Sokolovsky (1964) lo encontraron en esta misma proteína tratada con álcali. La presencia de LAL se ha demostrado en hidrolizados ácidos de varias proteínas tratadas con álcali tales como lisozima, queratina, ribonucleasa, lana, seda, y aislado de proteína de soya.

Este nuevo aminoácido se forma a partir de la interacción de los residuos lisil y dehidroalanil, dando como resultado ϵ_{N^S} -(DL-2-amino-2-carboxietil)-L-lisina. Debido a su origen, sus descubridores estuvieron de acuerdo en concederle el nombre de lisinoalanina (LAL). Bohak (1964) sugirió tentativamente que LAL se forma cuando se encuentra presente la secuencia cis-lis en una proteína. Conociendo la secuencia de RNasa, Bohak (1964) y Patchornik y Sokolovsky (1964) pudieron establecer que también puede existir una interacción específica de dos residuos que se

encuentran alejados el uno del otro debido a una configuración específica. La conformación de las cadenas tienen una influencia considerable sobre las reacciones. Así, el doblamiento de las cadenas podría acercar a las cadenas laterales reactivas a pesar de que estos grupos no se encuentren asociados en la secuencia primaria (Asquith *et al*, 1969). Otros residuos de LAL se generan a partir de secuencias todavía desconocidas (Hayashi y Kameda, 1980a). El esquema de formación de LAL se muestra en la Figura 1.

b) Ocurrencia de Lisinoalanina.

Se pensaba que LAL existía únicamente en proteínas tratadas con álcali; pero también se ha encontrado en péptidos de origen microbiano, como la cinamicina aislada de *Streptomyces cinnamoneus* y la duramicina aislada de *Streptomyces cinnamoneus* forma azacoluta (Gross, 1977).

Sternberg y colaboradores (1975a) detectaron después de llevar a cabo el análisis de un gran número de alimentos que la LAL se encuentra presente tanto en productos preparados comercialmente como en aquéllos hechos en casa, a pesar de que estos no hayan sido sometidos a tratamiento alcalino. De particular importancia fue el descubrimiento de LAL en la leche condensada, caseína ácida, muslo de pollo cocido, carne de res y residuos de frituras que en ningún momento fueron expuestos a un medio alcali

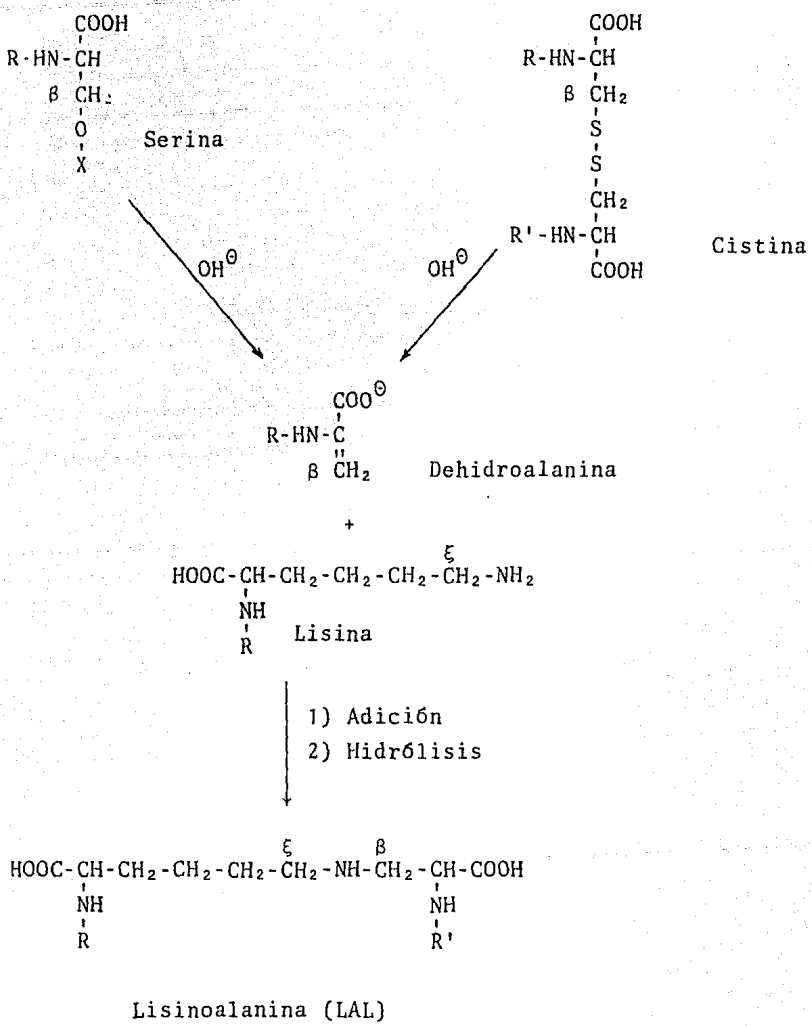


FIGURA 1. FORMACION DE LISINOALANINA.

no. El calor puede causar fisión del enlace disulfuro, dando como resultado dehidroalanina (Hurrel y Carpenter, 1977), y por lo tanto la posibilidad de formación de LAL.

c) Efectos Biológicos de la Lisinoalanina.

La actividad biológica de los "nuevos aminoácidos" se desconoce en la actualidad. A pesar de que existe gran controversia sobre los efectos tóxicos de la lisinoalanina (Gould y Mac Gregor [1977]), se ha correlacionado una lesión renal en ratas con una dieta de proteínas tratadas con álcali y que contienen LAL (Woodard y Short, 1973; Van Beek *et al*, 1974; de Groot *et al*, 1976a). Esta lesión, conocida como nefrocitomegalia, consiste en el aumento del tamaño del núcleo (y en ocasiones también del citoplasma) de las células epiteliales de los túbulos proximales del riñón; esto no necesariamente implica un mal funcionamiento renal específico.

JUSTIFICACION DEL TRABAJO,

En la actualidad, el maíz es la fuente principal de energía y proteínas en la alimentación de muchos pueblos de Mesoamérica, particularmente México.

En el Cuadro 1 se presenta el contenido de nutrimentos presentes en el grano de maíz y la cantidad consumida diaria.

CUADRO 1. COMPOSICION DEL MAIZ Y RECOMENDACIONES PARA EL CONSUMO DE NUTRIMENTOS.

	COMPOSICION DEL MAIZ (en 100 g) ¹	CONSUMO DIARIO ²	RECOMENDACIONES ³	
			HOMBRES	MUJERES
Agua	13.8			
Energía (Kcal)	348.0	1,566.0	3,000.0	2,100.0
Proteínas (g)	8.9	40.05	56.0	41.0
Lípidos (g)	3.9			
Carbohidratos (g)	Total= 72.2 Fibra= 2.0			
Cenizas (g)	1.2			
Calcio (mg)	22.0	99.0	800.0	700.0
Fósforo (mg)	268.0	1,206.0	800.0	700.0
Fierro (mg)	2.1	9.45	10.0	14.0
Sodio (mg)	1.0	4.5	1100-3300	
Potasio (mg)	284.0	1,278.0	1875-5625	
Vitamina A (µg Eq)	148.0	668.0	1,515.0	1,212.0
Tiamina (mg)	0.37	1.66	1.5	1.1
Riboflavina (mg)	0.12	0.54	1.8	1.3
Niacina (mg)	2.2	9.9	20.0	14.0
Acido Ascórbico (mg)	0	0	30.0	30.0

¹ Watt, B.K. (1975).

² Suponiendo una ingesta diaria de 450 g de maíz sin tratar.

³ Nat. Acad. Sci. (1974). Recomendaciones para individuos normales promedio entre 18 y 34 años de edad.

mente, suponiendo que el adulto rural ingiere, en promedio 450 g de maíz. De acuerdo a las recomendaciones de la *National Academy of Sciences* (1974), se puede calcular que el maíz proporcionaría aproximadamente la mitad de la energía (Kcal/totales) y el 70% de la proteína y del hierro, el 50% de la vitamina A y de la niacina, y la tercera parte de la riboflavina y del potasio; el maíz proporcionaría únicamente una mínima parte del calcio y del sodio requeridos, pero lograría satisfacer totalmente las cantidades de fósforo y tiamina.

El valor biológico de la proteína del maíz es 37% con respecto al huevo. En el Cuadro 2 se presenta su contenido de aminoácidos indispensables y se compara con el patrón recomendado por FAO/OMS (1973). Como se observa, además de una marcada deficiencia de lisina y triptofano, el maíz contiene una cantidad excesiva de leucina; el problema de este exceso se acentúa debido a la desproporcionada relación de leucina/isoleucina (Gopalan y Kamala, 1975).

En México el maíz se consume en forma de nixtamal; la composición del maíz se ve modificada por el proceso térmico-alcalino al que es sometido el grano (Bressani *et al*, 1958). Es

CUADRO 2. CONTENIDO DE AMINOACIDOS INDISPENSABLES DEL MAIZ
Y RECOMENDACIONES DE FAO.

	g / 16 g N	
	MAIZ ¹	PATRON DE FAO ²
Lisina	3.0	5.5
Triptofano	0.7	1.0
Cistina	1.7	{ 3.5
Metionina	2.6	
Treonina	3.6	4.0
Valina	5.0	5.0
Isoleucina	3.7	4.0
Leucina	12.8	7.0
Tirosina	4.9	{ 6.0
Fenilalanina	5.1	

NOTA: Obsérvese la marcada deficiencia del maíz en lisina y triptofano. La relación leucina/isoleucina es aproximadamente dos veces la considerada como óptima.

¹ Wang, D.I.C. (1978)

² FAO/OMS (1973)

sorprendente el hecho de que a pesar de que la tortilla es la base de la alimentación de varios millones de seres humanos, existen tan pocos estudios sobre ella. La mayoría de estos estudios se refieren a la actividad pelagragénica del maíz (Laguna y Carpenter, 1951; Cravioto *et al*, 1952; Harper *et al*, 1958; Kodicek *et al*, 1959), a la gelatinización del almidón (Trejo y Wild, 1976); y a la suplementación del maíz para obtener dietas de mejor calidad (Mc Pherson y Ou, 1976; Bressani *et al*, 1963, 1968 y 1972).

A pesar de que aproximadamente el 70% de las proteínas que ingiere el mexicano provienen del maíz nixtamalizado, los únicos estudios que se han realizado sobre las proteínas del nixtamal se refieren a la pérdida (ya sea física o por modificación química) de algunos aminoácidos (Bressani y Scrimshaw, 1958; Provansal *et al*, 1975; Sternberg *et al*, 1975 - a Sanderson *et al*, 1978; Tovar y Carpenter, 1982). Resulta, por lo tanto, de gran interés realizar un mayor número de investigaciones sobre las posibles modificaciones en las proteínas del maíz sometido a tratamiento alcalino.

En páginas anteriores se describieron algunas de las reacciones que se pueden llevar a cabo sobre las proteínas cuando se someten a condiciones de pH alto. El proceso de nixtamaliza-

ción al que se expone el maíz representa condiciones alcalinas severas. Este hecho condujo a plantear la hipótesis de que las proteínas del maíz sufren modificaciones durante la nixtamalización. Por lo tanto este trabajo tiene por objeto comprobar esta hipótesis determinando algunos de los cambios que posiblemente sufran las proteínas del maíz durante la nixtamalización.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar algunos de los posibles cambios que sufren las proteínas del maíz debido al proceso de nixtamalización. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar si existen algunos cambios, tanto cuantitativos como cualitativos, en las fracciones proteínicas del maíz debidos a la nixtamalización.

Para ello se extraerán las distintas fracciones proteínicas del maíz de acuerdo a su solubilidad.

2. Determinar la aparición de la lisinoalanina en el maíz tratado.

Se determinará la presencia de lisinoalanina en hidrolizados de maíz nixtamalizado por medio de un análisis de aminoácidos. Esta determinación se llevará a cabo en el maíz H-28 F-2 utilizado a lo largo de todo el estudio, así como sobre el maíz opaco-2, debido a que al contener esta variedad mayor cantidad de lisina que otros maíces, se aumenta la posibilidad de formación de LAL.

Al contar con los aminogramas de los maíces sin tratar y nixtamalizados, también será posible determinar modificaciones globales en el patrón de aminoácidos.

3. Determinar si el tratamiento térmico-alkalino al que es sometida la proteína del maíz durante el proceso de nixtamalización resulta, en términos generales, benéfico desde el punto de vista de la nutrición.

Para efectuar esta evaluación, se considerarán los resultados obtenidos de los puntos anteriormente mencionados y se llevará a cabo una prueba biológica de relación de eficiencia proteínica.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

El trabajo se llevó a cabo con maíz cristalino híbrido H-28 F-2 de precocidad intermedia, adaptado a Valles Altos, de la cosecha de 1978, campo de Chapingo, donado por el Dr. Joaquín Ortiz Cereceres, del Colegio de Postgraduados de Chapingo, México; y con maíz opaco-2 TL-79B 1801 (Flint), TEMPERATE X TROPICAL H.E.O₂ donado por la Dra. Evangelina Villegas, del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN.

Las mazorcas se almacenaron en el cuarto frío a 10°C hasta el momento de ser desgranadas. Las condiciones de nixtamalización empleadas fueron las más drásticas dentro de la forma tradicional utilizada en México. Se partió de 100 g de maíz, con una proporción de agua de 3:1 (volumen:peso) y 2 g de cal comercial. El grano se hirvió durante 30 minutos en estufa de gas en un matraz erlenmeyer de 1 litro, agitando ocasionalmente, y se dejó reposar 14 horas (durante la noche, como se hace tradicionalmente), tiempo después del cual se separó el maíz nixtamalizado del nejayote, y se lavó 2 veces con agua. El proceso de nixtamalización utilizado se muestra en la Figura 2.

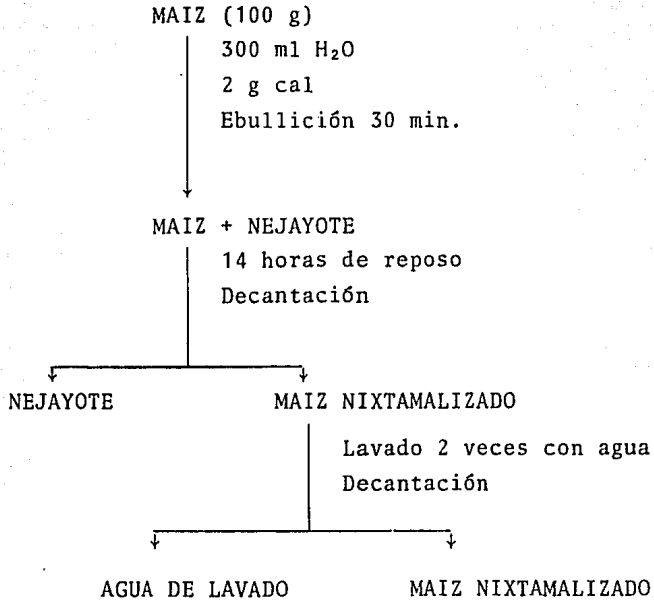


FIGURA 2 . PROCESO DE NIXTAMALIZACION.

El nejayote y el agua de lavado se juntaron y se concentraron en un Rotavapor (Büchi-R). Este concentrado se congeló con acetona y hielo seco y se liofilizó en una Liofilizadora Labconco Freeze-Dry 3. El nejayote liofilizado se pesó y se determinó el contenido de nitrógeno por el método de Macrokjeldahl usando selenio como catalizador (Pearson, 1973), haciéndose la digestión en un Digestor Labconco 60 301.

PREPARACION DE LA HARINA.

El maíz nixtamalizado (NIXT) lavado se secó en una estufa con vacío J.M. Ortiz, Modelo 774, a una temperatura de 40°C durante aproximadamente 4 horas.

Tanto el maíz sin tratar (ST) como el nixtamalizado (seco), se molieron en un molino Super Line SC-ES hasta obtener un tamaño de partícula capaz de atravesar la malla 60. El método utilizado en la preparación de la harina se muestra en la Figura 3.

Todos los experimentos que se describen a continuación se realizaron tanto con harina de nixtamal como de maíz sin tratar, ya que éste se empleó como control.

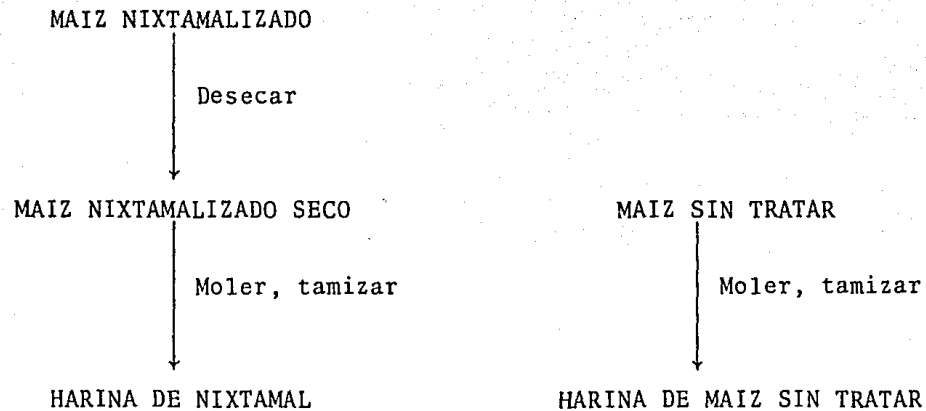


FIGURA 3 . PREPARACION DE HARINA.

ANALISIS BROMATOLOGICO GENERAL,

Se determinó el contenido de humedad, extracto etéreo y nitrógeno de las harinas de maíz H-28 F-2 y opaco-2 antes y después de la nixtamalización de acuerdo con los siguientes métodos:

a) Humedad.

A las harinas de maíz ST y NIXT se les determinó el contenido de humedad en una Termobalanza Ohaus Modelo 6010. Se pesaron 10 g de harina y se calentó hasta obtener un peso constante. El aparato da directamente la lectura de la cantidad de humedad en la muestra.

b) Extracto Etéreo.

Se determinó el contenido de extracto etéreo de las harinas sin tratar y nixtamalizada con el método de Soxhlet (AOAC, 1970a), usando éter etílico como solvente y colocando en los cartuchos 1 g de muestra. Se calentó con canastilla y reóstato (T-40) durante 8 horas. (Este método cuantifica lípidos y lipoides).

c) Nitrógeno.

Se determinó el contenido de nitrógeno de la harina de maíz ST y NIXT por el método de Macrokjeldahl (AOAC, 1970b). Con la cantidad de nitrógeno obtenida se calculó el contenido de proteína cruda, utilizando el factor de conversión de 6.25. Se rea-

lizó una prueba "t" de acuerdo a Bader (1980) con el objeto de determinar si las diferencias en el contenido de proteínas eran estadísticamente significativas.

EXTRACCION DE PROTEINAS.

Para la extracción de proteínas de acuerdo a su solubilidad, se utilizaron las técnicas descritas por Hansel y colaboradores (1973) y Paulis y colaboradores (1975). Las harinas de maíz H-28 F-2 sin tratar y de nixtamal se desgrasaron antes de efectuar la extracción.

METODO DE HANSEL.

En la Figura 4 se muestra la técnica de extracción de proteínas descrita por Hansel y colaboradores (1973).

a) Extracción de Albúminas.

10 g de harina desgrasada se agitaron con 150 ml de agua desionizada durante 12 horas en el cuarto frío (5°C), y se centrifugaron a 1000 x g durante 30 minutos en una centrífuga Damon IEC Modelo HT. El residuo se lavó 2 veces agitando durante 1 hora con 75 ml de agua. Se unieron los 3 sobrenadantes y se bajó el pH hasta 2.7 con una solución de tungstato de sodio (5 g de tungstato de sodio, 6 g de fosfato de sodio monobásico anhidro en

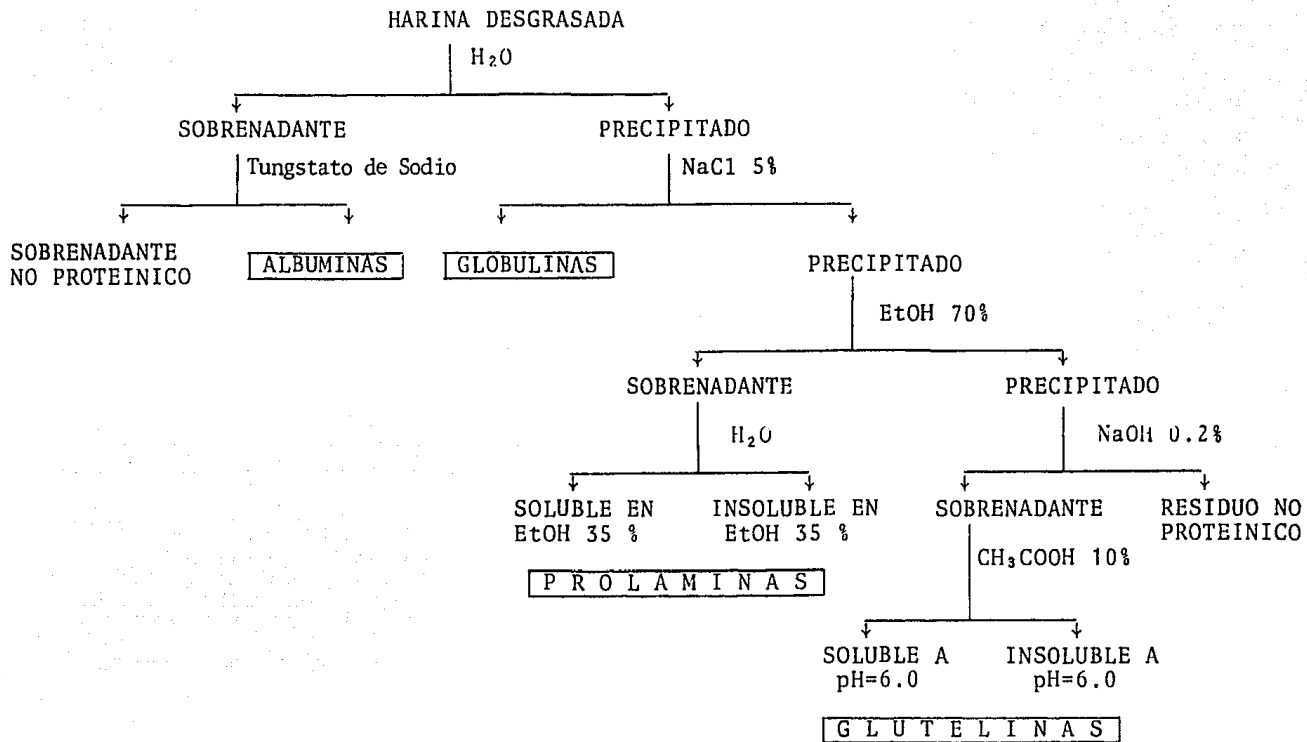


FIGURA 4 . EXTRACCION DE PROTEINAS POR EL METODO DE HANSEL (Hansel *et al*, 1973)

500 ml de HCl 0.88 N). La solución permaneció a 5°C por 12 horas y la mezcla se centrifugó a 1000 x g durante 30 minutos. El precipitado obtenido se dializó contra agua, se concentró en rotavapor y se liofilizó.

b) Extracción de Globulinas.

El residuo obtenido después de la extracción con agua se trató con una solución de NaCl al 5%, siguiendo el mismo procedimiento que en la extracción de albúminas, exceptuando la segunda lavada, en la cual se utilizó agua en lugar de NaCl. El sobrenadante se dializó contra agua, se concentró en rotavapor y se liofilizó.

c) Extracción de Prolaminas.

El residuo del tratamiento con NaCl se resuspendió en etanol al 70%. El procedimiento fue el mismo que el efectuado con agua, excepto que la agitación se llevó a cabo a temperatura ambiente por 5 horas. Se combinaron los 3 sobrenadantes y se añadió agua hasta obtener una concentración final de etanol de 35%. La solución se centrifugó y el precipitado se liofilizó, obteniéndose la fracción insoluble en etanol al 35%. El sobrenadante se concentró y liofilizó. El residuo constituyó la fracción soluble en etanol al 35%. Tanto la fracción soluble como la insoluble se consideran prolaminas.

d) Extracción de Glutelinas.

El residuo del tratamiento alcohólico se trató con una solución de NaOH al 0.2%. El procedimiento fue el mismo que para la extracción con etanol. Al extracto de NaOH se añadió ácido acético al 10% (p/v) hasta alcanzar un pH= 6. La solución se centrifugó y el precipitado se liofilizó, obteniéndose la fracción insoluble a pH= 6. El sobrenadante se dializó contra agua, se concentró y liofilizó, obteniéndose la fracción soluble a pH= 6.

Para detectar el almidón (o dextrinas originadas por hidrólisis), se añadió una pequeña cantidad de proteína, una gota de la solución de lugol (KI₃) según Glick (1949), obteniéndose en la mayoría de los casos, resultado positivo. Se trató entonces de solubilizar dicho almidón, agitando 1 mg de muestra durante 5 horas a temperatura ambiente en 10 ml de dimetil sulfóxido (DMSO) al 90% (Paulis *et al*, 1969; Nielsen *et al*, 1970). Se centrifugó a 20,000 x g durante 1½ horas. El precipitado se liofilizó y se ensayó nuevamente con lugol.

A pesar del tratamiento con DMSO, se seguía detectando almidón en la fracción de glutelinas, por lo que se sustituyó el método de extracción por el de Paulis y colaboradores (1975). Este método utiliza β-mercaptoetanol para romper los enlaces disulfuro permitiendo liberar el almidón atrapado en ellos, facilitando

se así la obtención de glutelina pura.

METODO DE PAULIS.

En la Figura 5 se muestra la técnica de extracción de proteínas descrita por Paulis y colaboradores (1975).

a) Extracción de Albúminas.

Se agitaron en el refrigerador 10 g de harina de maíz previamente desgrasada, con 50 ml de agua desionizada durante 1 hora y se centrifugaron a 20,000 x g durante 30 minutos. El precipitado se agitó con 25 ml de agua, durante 1 hora y se centrifugó nuevamente. Los sobrenadantes se unieron, se dializaron contra agua en el refrigerador y se concentraron en el rotavapor antes de liofilizarlos. Esta es la fracción de albúminas (A).

b) Extracción de Globulinas.

El precipitado obtenido después de la extracción con agua se agitó con 50 ml de NaCl 0.5M durante 1 hora en el refrigerador y se centrifugó a 20,000 x g durante 1 hora. El precipitado se agitó con 25 ml de NaCl 0.5M y se centrifugó; el precipitado se agitó con 25 ml de agua y se centrifugó nuevamente. Los sobrenadantes de las 3 centrifugaciones se unieron. Se dializó contra agua, se concentró y se liofilizó obteniéndose la fracción de globulinas (B).

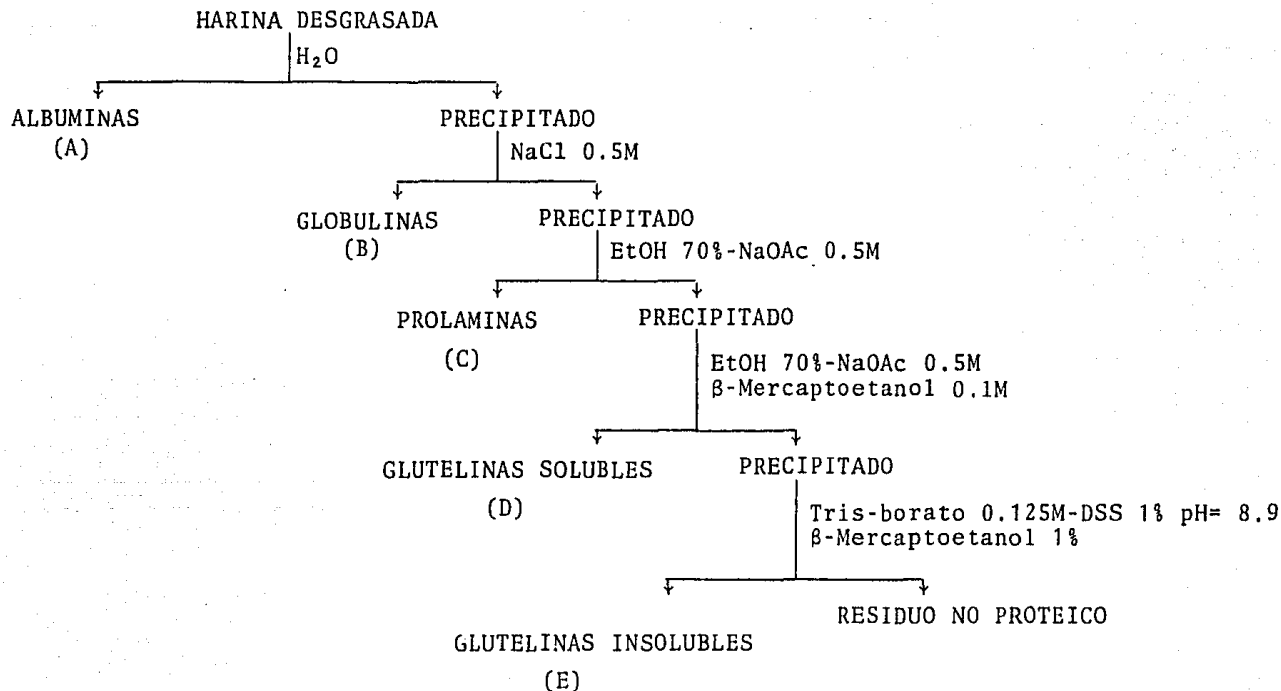


FIGURA 5. EXTRACCION DE PROTEINAS POR EL METODO DE PAULIS.
(Paulis *et al*, 1975).

c) Extracción de Prolaminas.

El precipitado de la extracción con NaCl 0.5M, lavado con agua se agitó con 100 ml de etanol 70%-acetato de sodio (NaOAc) 0.5 % durante 1 hora a temperatura ambiente y se centrifugó. Esta operación se llevó a cabo 3 veces. Los sobrenadantes se mezclaron y este último se dializó contra etanol al 70%, se concentró y se liofilizó, obteniéndose la fracción de prolaminas (C).

d) Extracción de Glutelinas.

El precipitado de la extracción de prolaminas se agitó a temperatura ambiente con 100 ml de etanol 70%-NaOAc 0.5%- β -mercaptoetanol 0.1M durante $\frac{1}{2}$ hora y se centrifugó. Este procedimiento se llevó a cabo 2 veces. Se unieron los sobrenadantes, se dializaron contra una solución de etanol al 70%, se concentró y se liofilizó, obteniéndose la fracción de glutelinas solubles en alcohol (D).

Las glutelinas insolubles en alcohol se extrajeron incubando el residuo durante 16 horas a 37°C en una solución de trishidroximetilaminometano (tris)-borato-0.125M-dodecil sulfato de sodio (DSS) al 1% pH= 8.9- β -mercaptoetanol al 1%. El volumen de incubación correspondía a una cantidad de DSS igual al doble del peso de la proteína (determinada por el método de Kjeldahl). Después de la incubación, se llevó a cabo una centrifugación; el sobrenadante se concentró y se liofilizó. Este liofilizado

constituye la fracción de glutelinas insolubles (E).

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga Beckman JA-20 rotor J-14 a una temperatura de 4°C, en tubos de 250 ml de capacidad.

ANALISIS DE PROTEINAS.

Se detectaron los cambios en las diferentes fracciones proteínicas del maíz H-28 F-2, debidos a la nixtamalización, tanto cuantitativa como cualitativamente.

ANALISIS CUANTITATIVO.

El análisis cuantitativo de las fracciones proteínicas se realizó por los métodos de Lowry y de Microkjeldahl.

Con el objeto de determinar si existía diferencia significativa entre la cantidad de proteína obtenida en las diferentes fracciones extraídas de la harina de maíz sin tratar con respecto a la de nixtamal, se efectuó una prueba "t" de acuerdo a Bader, 1980.

a) Método de Lowry.

La cuantificación de proteína se llevó a cabo en las

fracciones obtenidas por las técnicas de extracción de Hansel y de Paulis anteriormente descritas, de acuerdo al método de Lowry (Lowry *et al*, 1951) utilizando albúmina sérica bovina (Sigma) como patrón y leyendo a 750 nm en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 30.

Las determinaciones se efectuaron en los extractos después de la diálisis y la liofilización; para ello, el liofilizado se disolvió en agua (cuando se trataba de material insoluble, la disolución se hizo en agua a la que se había agregado unas gotas de NaOH; los controles también contenían NaOH). Por conveniencia, a este tipo de cuantificación se le denominará Lowry sólido.

También se cuantificó la proteína directamente en el medio de extracción, antes de la diálisis, concentración y liofilización. Los controles variaban según la solución de extracción. (En adelante se referirá a este método como Lowry líquido).

b) Método de Microkjeldahl.

El método de microkjeldahl que utiliza selenio como catalizador (Pearson, 1973) también fue empleado para la cuantificación de proteína disuelta en el medio de extracción. Se usó el factor de conversión de 6.25 y el volumen de la muestra fue de 0.2-0.4 ml.

ANALISIS CUALITATIVO.

Las modificaciones a nivel cualitativo de las fracciones proteínicas extraídas del maíz H-28 F-2 por el método de Paulis se determinaron por medio de electroforesis.

La electroforesis se llevó a cabo en geles de poli-acrilamida en placa, utilizando un aparato vertical fabricado con material acrílico y alambre de platino, con capacidad para una placa de 14.5 x 15 cm y un volumen total de 800 ml de solución amortiguadora. Se escogió la técnica en placa ya que presenta las siguientes ventajas sobre el tubo: la resolución es mejor, la cantidad de muestra requerida es menor, se pueden hacer mejores comparaciones de una muestra con respecto a otra y se pueden deshidratar para conservar por tiempo indefinido.

a) Geles de acrilamida al 10%.

Los geles de acrilamida al 10% se prepararon utilizando la técnica de Davis (1964), con un sistema discontinuo (gel de separación al 10%, y gel de concentración al 4.5%) de acuerdo al Cuadro 3. El gel de concentración se añadió después de la polimerización completa del gel separador.

b) Geles de gradiente de acrilamida.

Se prepararon también geles de separación con gradiente

CUADRO 3. PREPARACION DE GELES DE ACRILAMIDA AL 10%.

	GEL DE SEPARACION AL 10% (ml)	GEL CONCENTRADOR AL 4.5% (ml)
H ₂ O	8.024	2.895
PSA al 10%	0.10	0.05
Acril 30%-Bis 0.8%	6.666	0.75
Tris-HCl 1.5M pH= 8.8	5.0	-
Tris-HCl 0.5M pH= 6.8	-	1.25
DSS al 10%	0.2	0.05
TEMED	0.010	0.005

PSA Persulfato de amonio (por ser inestable esta solución debe prepararse en el momento de usarse).

ACRIL Acrilamida. Se recrystalizó en cloroformo (70 g/l)

Bis N,N'-Metilen-bisacrilamida. Se recrystalizó en acetona (40 g/l)

Tris Trishidroximetilaminometano.

DSS Dodecil sulfato de sodio

TEMED N,N'-Trietilmetiletilendiamina.

de poliacrilamida utilizando una modificación de la técnica de Laemmli (1970). Se colocaron 10 ml de cada una de las dos soluciones con diferente concentración de acrilamida en un aparato para hacer gradientes (con capacidad para 60 ml) y se mezclaron agitando con una varilla de vidrio de un mezclador Caframo RZR1-64. Los gradientes de acrilamida utilizados fueron: 7.5-13%, 7.5-15%, 10-15%, 10-18%, 10-20%, 10-25%, y 10-30%, y se prepararon como se muestra en el Cuadro 4. Después de la polimerización del gel separador, se eliminó el agua de la superficie y se adicionó gel concentrador al 4.5%, de acuerdo al Cuadro 3.

Preparación de la muestra:

Se disolvieron 3 mg de proteínas liofilizadas en 0.5 ml de solución amortiguadora, preparada de la siguiente manera:

	ml
Tris 0.5M pH= 6.8	1.0
DSS 10%	1.0
β -Mercaptoetanol	0.1
Glicerol	1.0
Agua	6.9
Azul de Coomassie al 0.2%	0.005

Las proteínas se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga International Clinical Centrifuge, modelo CL. El sobrenadante se aplicó al gel de concentración de igual manera en los geles de acrilamida de 10% y en los de gradiente.

CUADRO 4 . PREPARACION DE GELES CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACRILAMIDA (GRADIENTES).

(ml)

	7.5 %	10%	13%	15%	18%	20%	25%	30%
H ₂ O	4.845	4.012	3.015	2.345	1.345	0.679	3.178	2.345
PSA al 10%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Acril 30%-Bis 0.8%	2.5	3.333	4.33	5.0	6.0	6.666	4.167*	5.0*
Tris-HCl 1.5M pH=8.8	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
DSS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
TEMED	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005

* Los geles con gradiente de acrilamida 10%-25% y 10%-30% se prepararon con una solución de acrilamida concentrada (acrilamida 60%-bisacrilamida 1.6%) debido a la limitación del volumen.

Procedimiento para desarrollar la electroforesis:

La solución amortiguadora para los electrodos fue de Tris 0.049M-0.1% DSS pH= 8.3.

Se utilizaron 2 fuentes de energía diferentes, una con diferencia de potencial constante (fabricado en el taller eléctrico de la Facultad de Química, UNAM), y otra con intensidad constante marca ISCO-490.

La corriente inicial fue de 10 mA; al entrar la proteína al gel de separación, se subió a 20 mA. El tiempo total empleado para la separación fue de 5½ horas cuando se tenía corriente constante, y 6 horas con diferencia de potencial constante. Se observó una ligera variación en el tiempo requerido para efectuar la separación cuando se trabajó con la fuente ISCO, debido a las diferentes concentraciones en los geles de gradiente.

Terminada la separación, el gel se tiñó con azul de coomassie al 0.2% en ácido tricloroacético (ATC) al 50% durante 20 minutos, y se destiñó con ácido acético al 7%. Se observó mayor nitidez en las bandas cuando se calentó entre 50 y 60°C durante el desteñido del gel. Este calentamiento también presentó la ventaja de que el proceso fue más rápido y el número de cambios de ácido acético fue menor.

En todos los casos se corrió la proteína del maíz nix-tamalizado junto a la del maíz sin tratar para poder observar con mayor facilidad los cambios, aparición y desaparición de bandas debido al tratamiento térmico-alkalino.

Se determinó el peso molecular de las proteínas principales obtenidas en geles con una concentración del 10% de acrilamida según el método de Weber y Osborn (1969), usando hexoquinasa, albúmina bovina, celulasa, α -amilasa, pepsina, tripsina, lactoglobulina, lisozima, α -quimotripsina y citocromo c, como proteínas patrón (Figura 5).

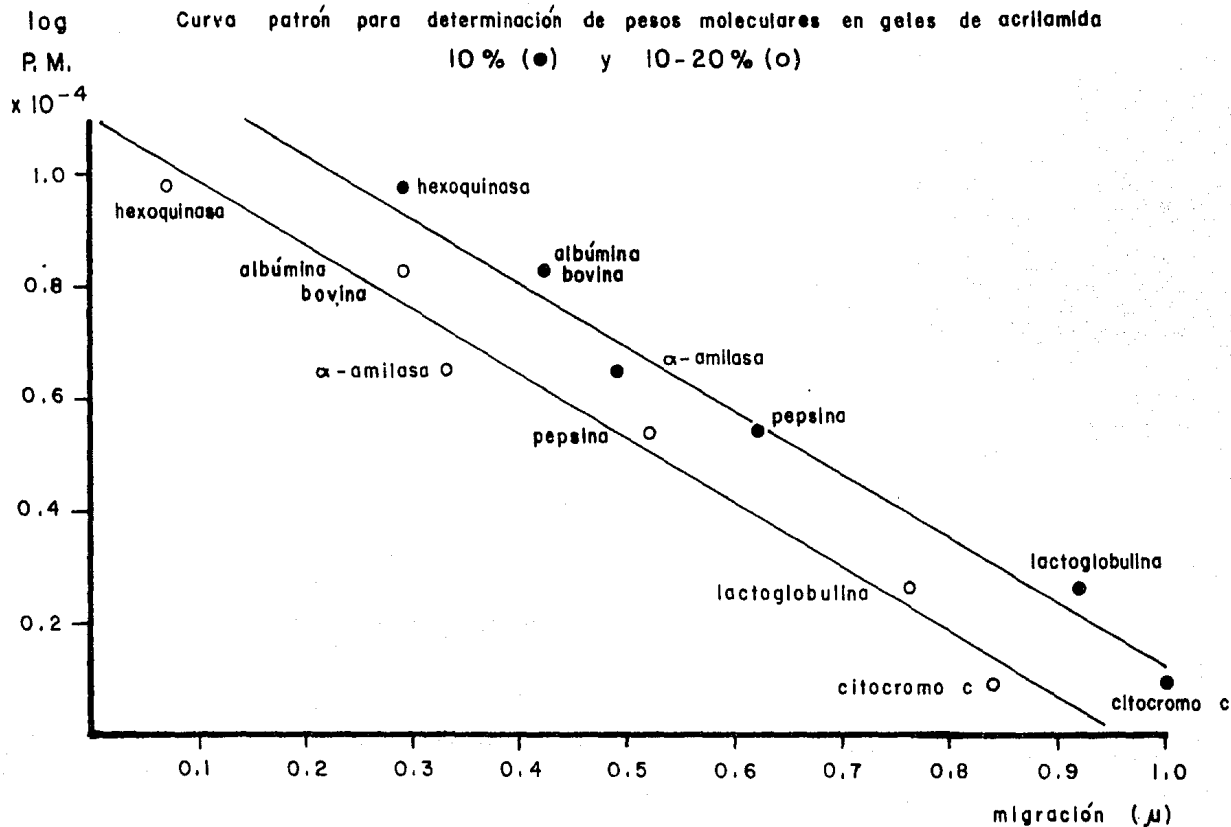
También se utilizó un gel con gradiente de concentración de acrilamida de 10-20% para lo cual se verificó con anterioridad la validez de esta técnica.

La migración real (μ) de las proteínas está dada por:

$$\mu = \frac{\text{distancia recorrida por la proteína}}{\text{distancia recorrida por el colorante}}$$

Estas distancias se midieron a partir de la unión de los geles concentrador y separador hasta los puntos en que se localizaban la proteína y el frente (dado éste por el azul de coomassie aplicado inicialmente junto con la muestra), después de haberse desteñido el gel con ácido acético.

FIGURA 5.



Los geles se secaron calentando al vacfo sobre papel filtro en un secador de geles planos modelo 224 de Bio-Rad.

ANALISIS DE AMINOACIDOS.

El análisis de aminoácidos se realizó en las harinas sin tratar y de nixtamal de los maices H-28 F-2 y opaco-2. Este análisis se llevó a cabo con el fin de detectar la formación de lisinoalanina (LAL). Por lo tanto se introdujo también LAL a la mezcla de patrones, la cual fue generosamente donada por los Dres. P. Slump y J.C. Woodard.

Se trabajó con un autoanizador marca Technicon modelo NC-2P utilizando una columna de 5 x 470 mm a una temperatura de 60°C con un flujo constante de 0.44 ml/min. El tipo de resina utilizada fue C-3 de Technicon colocada a una altura de cama de 420 mm. Se utilizaron soluciones amortiguadoras de acetatos con pH= 3.9, 4.1 y 5.0.

a) Hidrólisis Acida.

La hidrólisis ácida de la muestra se llevó a cabo según la técnica de Moore y Stein (1963) con algunas modificaciones principalmente en el tiempo y la temperatura debido a las observaciones y recomendaciones de Lucas (comunicación personal): Harina

de maíz, equivalente a 50 mg de proteína, se colocó en un tubo con tapón de rosca Pyrex No. 9825 con 2 ml de HCl 6N y se congeló; se adicionó nitrógeno purificado (flujómetro con 4-5 unidades/30-45 seg) y se metió a un baño de aceite dentro de una estufa Thelco 19, donde permaneció a 110°C durante 22 horas. Se lavó con agua.

b) Hidrólisis Alcalina.

La hidrólisis alcalina se llevó a cabo según el método de Lucas y Sotelo (1980). A un equivalente de 100 mg de proteína se le adicionaron 4 ml de LiOH 4N, se congeló y se inyectó nitrógeno. Se calentó a 145°C durante 8 horas. Se lavó con H₃PO₄ al 85% y se neutralizó. El lavado final se hizo con una solución de agua:etanol 3:1 con hidroxiquinona al 0.01% (como antioxidante).

c) Cromatografía en Capa Fina.

Para verificar que la LAL no se había hidrolizado durante el tratamiento con HCl, se hizo una cromatografía ascendente en una placa de sílica gel 60 de 10 x 20 cm con un espesor de cama de 1.0 mm (Merck) de acuerdo a Sternberg y colaboradores (1975b). En la placa se colocó LAL, lisina, LAL hidrolizada con HCl 6N a 110°C durante 22 horas, hidrolizado de maíz sin tratar e hidrolizado de maíz nixtamalizado.

La cromatografía se efectuó en un sistema de solvente

butanol-ácido fórmico-agua (23:4:5) durante 8 horas. Se secó la placa y se corrió una segunda vez en la misma dirección por $4\frac{1}{2}$ horas. La placa se roció con ninhidrina y se reveló calentando en la estufa a 100°C durante 10 minutos.

PRUEBAS BIOLÓGICAS.

Se llevó a cabo un estudio de relación de eficiencia proteínica (REP) a 14 días con 5 lotes de 6 ratas por lote, de acuerdo a Osborne y colaboradores (1919).

a) Animales y Especificaciones.

Se seleccionaron 30 ratas albinas Wistar machos de 21 días de edad, nacidas en el Bioterio de la Facultad de Química. Después del destete se mantuvieron todas juntas durante un día en una dieta de chow en forma de pastilla. Las ratas se pesaron y se colocaron al azar, en donde se les asignó una de 5 dietas diferentes. La asignación de estas dietas se decidió organizando lotes de 6 ratas cada uno, de manera que la diferencia de peso entre ellos no fue mayor de 0,3 g.

Los animales tuvieron acceso libre al agua y al alimento desde la iniciación hasta el final del experimento. La temperatura del cuarto fluctuó entre 19 y 24°C y la iluminación artifi

cial se mantuvo 14 horas por 10 horas de obscuridad. Las ratas se pesaron cada 3 días y se registró la ingestión de alimento.

b) Preparación de Dietas.

Las dietas específicas para cada grupo se prepararon tomando harina de maíz H-28 F-2 como base, de tal manera que fueran isoproteínicas e isocalóricas a expensas del azúcar. La diferencia entre las dietas radicaba principalmente en el tipo de tratamiento que había sufrido la harina de maíz: maíz sin tratar, maíz cocido y maíz nixtamalizado. Las formulaciones de las dietas se presentan en el Cuadro 6.

La cantidad de harina de la dieta se calculó de tal manera que suministrara en todos los casos 7.8 g de proteína/100 g de dieta. Por lo tanto, la concentración de proteína de las dietas II y V se vió incrementada a 9.6 g/100 g de dieta, debido a la suplementación exógena con los aminoácidos lisina, triptofano, isoleucina y metionina.

Las dietas se mezclaron el día anterior al inicio del experimento y se guardaron a 4°C en bolsas de plástico. Las vitaminas se mezclaron con los minerales y esto a su vez con el azúcar; en el caso de las dietas suplementadas, se incorporó la premezcla de aminoácidos. El aceite de maíz se mezcló con alícuotas de ha-

CUADRO 6 . FORMULACION DE LAS DIETAS.

	g/100 g				
	MAIZ SIN TRATAR		MAIZ COCIDO	MAIZ NIXTAMALIZADO	
	I	II	III	IV	V
Harina de maíz	90	90	86.976	84.08	84.08
Vitaminas*	1	1	1	1	1
Minerales*	3	3	3	3	3
Aceite*	1	1	1	1	1
Azúcar	5	2.45	8.024	10.92	9.072
Lisina-HCl	-	1.096	-	-	1.096
Triptofano	-	0.118	-	-	0.118
Isoleucina	-	0.288	-	-	0.288
Metionina	-	0.346	-	-	0.346
CaCO ₃	-	0.7	-	-	-

La concentración de proteína en las dietas determinada por Macrokjeldahl fue: I, 8.5%; II, 10.0%; III, 8.5%; IV, 8.2% y V, 9.1%.

*Vitamin Fortification Mix. Cat. No. 40060. Teklad. Test Diets, Madison, Wisconsin.
 Mineral Mix Rogers-Harper. Cat. No. 170760. Teklad. Test Diets, Madison, Wisconsin.
 Aceite puro de maíz La Gloria.

rina y luego todo junto se hizo pasar 3 veces a través de un tamiz. Todos los ingredientes se mezclaron finalmente en un mezclador automático de acero inoxidable durante 30 minutos.

Con el objeto de verificar la cantidad de proteína presente en cada dieta, se llevó a cabo un análisis de nitrógeno por el método de Macrokjeldahl, como se describió anteriormente; las concentraciones reales de proteína en las dietas se muestran en el Cuadro 6.

Al cabo de 14 días se determinó la ganancia de peso de cada rata, así como la cantidad total de proteína ingerida. Esta última se calculó por la diferencia entre el peso del total del alimento que se proporcionó a las ratas y el peso del alimento sobrante (tanto en el recipiente como el que estaba tirado), multiplicado por la concentración de proteína en la dieta.

La relación de eficiencia proteínica (REP) se obtuvo de la siguiente manera:

$$REP = \frac{\text{ganancia de peso (g)}}{\text{proteína ingerida (g)}}$$

Con el objeto de determinar si existía diferencia significativa entre los tratamientos, se realizó una prueba F de rango múltiple de acuerdo a Duncan (1955).

RESULTADOS

Todos los resultados reportados en este Capítulo se dan en peso seco.

NIXTAMALIZACION.

Se escogió un tiempo de nixtamalización de 30 minutos ya que después de ese lapso la cascarilla se desprende fácilmente del grano (éste es el indicador usado en los molinos de nixtamal para determinar el tiempo de cocimiento al que se debe someter el maíz).

Después de la nixtamalización y transcurridas las 14 horas de reposo del maíz, el pH del nejayote fue de 12.2. Al unirse éste con el agua de lavado (se hicieron 2 lavados), el pH disminuyó a 12.1 después de la primera lavada, y a 11.9 después de la segunda.

El nejayote obtenido es un líquido amarillo con algunas partículas de cascarilla en suspensión. Al concentrarse y liofilizarse, se obtuvo un 6.36% del peso original del maíz. El balance de sólidos totales se muestra en la Figura 6.

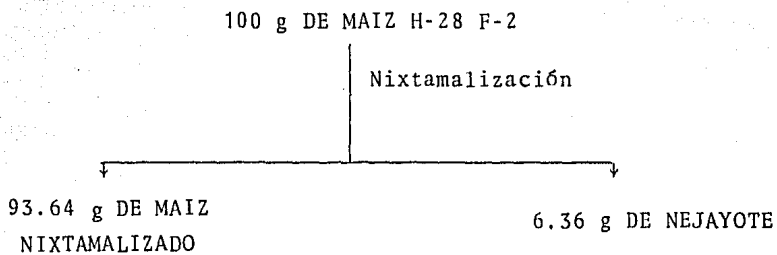


FIGURA 6 BALANCE DE SOLIDOS TOTALES.

ANALISIS BROMATOLOGICO GENERAL.

El contenido de nitrógeno en el nejayote fue de 0.5 g/100 g por lo que la cantidad de proteína cruda calculada fue de 2.9 g/100 g de nejayote.

Se efectuó el análisis de humedad, extracto etéreo y nitrógeno sobre las harinas de maíz H-28 F-2 antes y después de la nixtamalización. Los resultados de estas pruebas se muestran en el Cuadro 7

El contenido de proteína cruda del maíz H-28 F-2 y del opaco-2 se calculó a partir del nitrógeno determinado por el método de Macrokjeldhal utilizando el factor de conversión de 6.25. Estos resultados se muestran en el Cuadro 8 .

Con el objeto de determinar si el cambio detectado en el contenido de proteína en las harinas debido a la nixtamalización tenía significancia estadística, se realizó una prueba "t". Los resultados del Cuadro 8 indican que no existe diferencia significativa entre el contenido de proteína del maíz sin tratar y el del nixtamalizado al nivel de probabilidad de 0.001.

La Figura 7 muestra el resultado del balance de proteína cruda para el H-28 F-2 después de ser sometido al tratamiento

CUADRO 7. ANALISIS BROMATOLOGICO GENERAL DEL MAIZ H-28

F-2.

	g/100 g de Maíz	
	ST	NIXT
Humedad	13	13
Extracto etéreo	5.85	5.82
Nitrógeno	1.28	1.34

CUADRO 8. CONTENIDO DE PROTEINA CRUDA DE LOS MAICES H-28
F-2 Y OPACO-2.

	g/100 g de Mafz Seco		n	Prueba "t"
	ST	NIXT		
<u>H-28 F-2</u>				
Nitrógeno	1.47	1.54	6	P > 0.001
Proteína	9.2	9.6		
<u>OPACO-2</u>				
Nitrógeno	1.84	1.86	6	P > 0.001
Proteína	11.5	11.6		

n Indica el número de determinaciones.

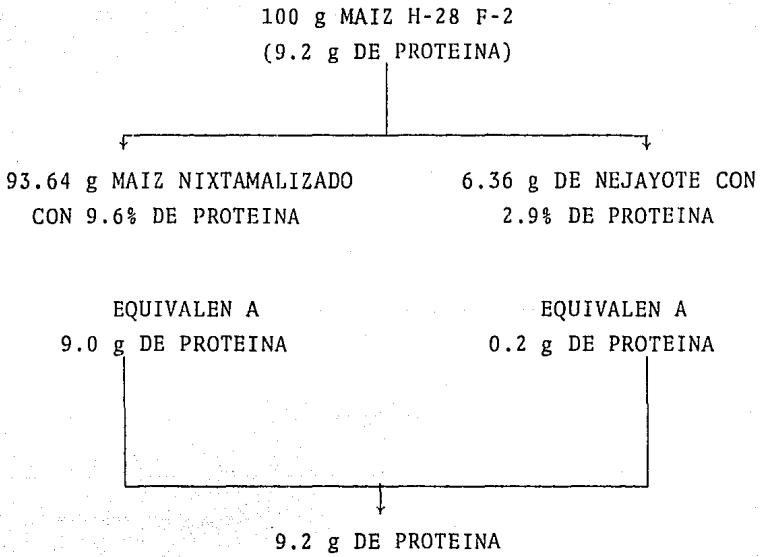


FIGURA 7. BALANCE DE PROTEINA DESPUES DE LA NIXTAMALIZACION.

térmico alcalino.

ANALISIS DE PROTEINAS,

Por conveniencia, en adelante se referirá a las proteínas extraídas de la harina de nixtamal como proteínas nixtamalizadas.

ANALISIS CUANTITATIVO.

La primera técnica utilizada en este trabajo para extraer proteínas fue la descrita por Hansel y colaboradores (1973). Las fracciones extraídas liofilizadas se pesaron y se les determinó el contenido de proteína por el método de Lowry sólido. Los rendimientos de extracción por la técnica de Hansel se muestran en el Cuadro 9.

En el Cuadro 9 se observa que solamente una pequeña cantidad del material extraído corresponde a proteína. Con objeto de determinar si la contaminación correspondía a material de tipo amiláceo, se llevó a cabo una prueba cualitativa rápida (lugol o KI_3 , descrita por Glick, 1949).

Como se puede observar en el Cuadro 9, por lo menos una parte de los contaminantes que afectan el rendimiento de extracción de las proteínas es almidón, por lo que se procedió a

CUADRO 9. EXTRACCION DE PROTEINAS POR EL METODO DE HANSEL*.

S O L I D O S	g de material liofilizado extraído a partir de 10 g de harina desgrasada		Concentración de proteína en el extracto g de proteína/100 g de material		Almidón Presente	
	ST	NIXT	ST	NIXT	ST	NIXT
A Solubles en agua (Albúminas)	0.030	0.020	32.7	36.6	+	+
B Solubles en NaCl (Globulinas)	0.080	0.094	40.6	15.3	-	x
C Solubles en EtOH al 35% (Prolaminas solubles)	0.194	0.261	6.9	6.2	-	-
	Insolubles en EtOH 35% (Prolaminas insolubles)	0.125	0.103	63.5	61.2	-
D Solubles en NaOH a pH= 6.0 (Glutelinas solubles)	0.276	0.079	21.4	28.1	+	+
	Insolubles en NaOH a pH=6.0 (Glutelinas insolubles)	0.514	0.248	44.0	43.5	+

*La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry sólido.

+ Presencia de almidón (coloración azul)

- Ausencia de almidón (coloración amarilla)

x En este caso se obtuvo una solución transparente. Se hicieron pruebas para determinar la causa de la desaparición de color. El almidón en contacto con cal daba una reacción similar en presencia de KI_3 .

intentar su eliminación. Se siguió la técnica descrita por Nielsen y colaboradores (1970) la cual utiliza dimetil sulfóxido (DMSO). El resultado obtenido con este método no fue el deseado ya que no sólo no produjo la eliminación total del almidón, sino que además el mismo DMSO resultó difícil de eliminar, por lo que se requirieron mas manipulaciones que produjeron una mayor pérdida de proteína.

Debido al bajo rendimiento obtenido y a la dificultad que presentaba la eliminación del almidón, se buscó una técnica que ofreciera mejores resultados de extracción. Se utilizó entonces el método descrito por Paulis y colaboradores (1975). Por medio de este método se logró eliminar el almidón presente en todas las fracciones proteínicas con excepción de las albúminas extraídas del maíz nixtamalizado.

Las fracciones extraídas se purificaron, concentraron, liofilizaron y se les determinó proteína por el método de Lowry sólido. Los rendimientos de extracción fueron, sin embargo bajos y poco reproducibles, perdiéndose material proteínico durante la manipulación. Por lo tanto, el procedimiento de purificación y liofilización se siguió únicamente con el objeto de contar con las muestras requeridas para las pruebas electroforéticas. Para efectos de cuantificación en la extracción se de-

terminó el contenido de proteína por el método de Lowry directamente en el extracto líquido. Las glutelinas, sin embargo, se determinaron del extracto líquido por el método de Microkjeldahl debido a que la solución utilizada para su extracción contiene β -mercaptoetanol y trishidroximetilaminometano, compuestos que interfieren con el método de Lowry. Los resultados de la extracción de proteínas por el método de Paulis se presentan en el Cuadro 10 .

Los resultados de la prueba "t" indican que únicamente existe diferencia significativa entre las cantidades de proteína extraída en las fracciones de albúminas y globulinas, después de la nixtamalización con respecto a las fracciones obtenidas a partir de maíz sin tratar.

ANÁLISIS CUALITATIVO.

El análisis cualitativo de las diferentes fracciones proteínicas se llevó a cabo por medio de electroforesis.

Inicialmente se usaron geles continuos con una concentración de acrilamida de 10%. La cantidad de muestra con la que se empezó a trabajar fue de 750 μ g. Con esta concentración de proteína, no se logró una separación adecuada. Únicamente se observaron algunas bandas en la parte superior del gel mientras que

CUADRO 10. EXTRACCION DE PROTEINAS POR EL METODO DE PAULIS*.

Fracción Proteínica	Proteína Extraída g/10 g de harina desgrasada		n	Prueba "t"
	ST	NIXT		
Albúminas (A)	0.140 ± 0.025	0.038 ± 0.010	4	P < 0 0.001
Globulinas (B)	0.085 ± 0.012	0.022 ± 0.005	5	P < 0 0.001
Prolaminas (C)	0.400 ± 0.025	0.380 ± 0.082	6	P > 0 0.001
Glutelinas solubles (D)	0.110 ± 0.055	0.150 ± 0.060	4	P > 0 0.001
Glutelinas insolubles (E)	0.298 ± 0.029	0.318 ± 0.042	4	P > 0 0.001

n Indica el número de determinaciones.

* La proteína se determinó por el método de Lowry líquido con excepción de la fracción proteínica de glutelinas para la cual se empleo el método de Microkjeldahl en líquido.

en la parte inferior (aproximadamente 30% de gel) se veía un gran "barrido"

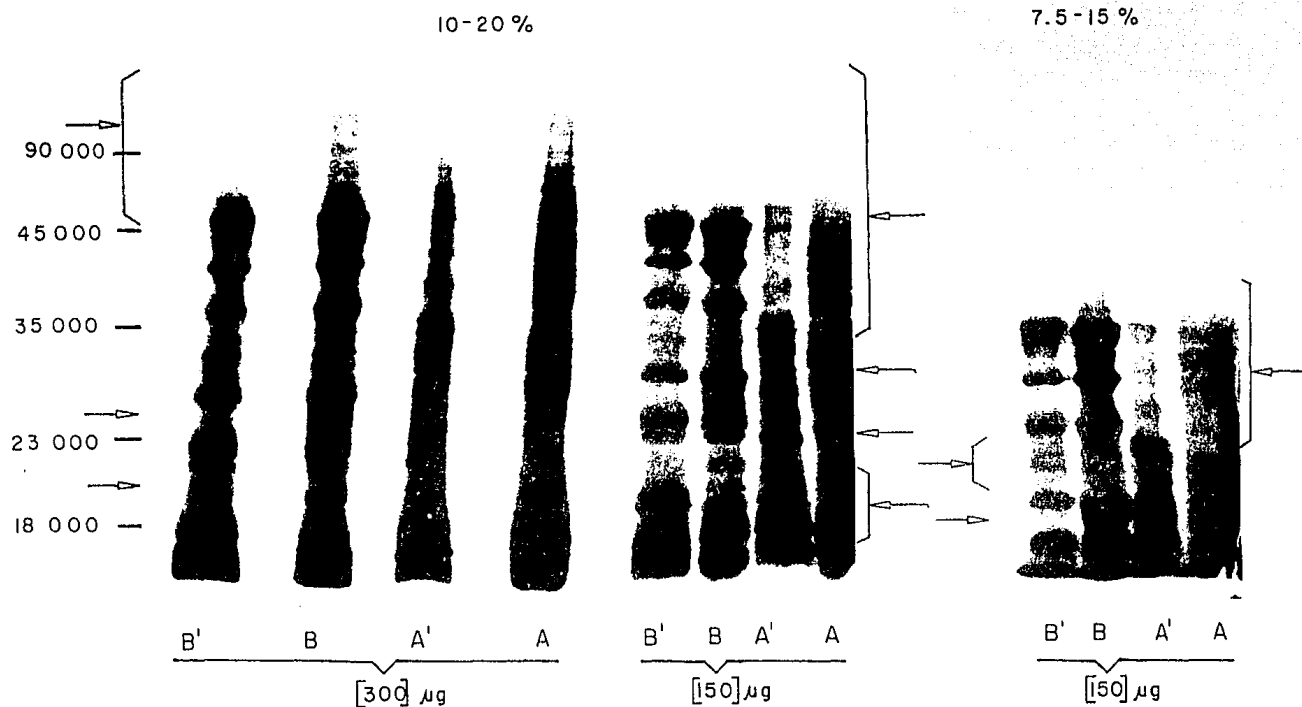
Se pensó que usando gradientes de acrilamida se podría separar el aglomerado de la parte inferior del gel por lo que se probó un gran número de combinaciones (como se describe en el Capítulo de Materiales y Métodos). Pese al gradiente, se siguieron observando "barridos" en la parte inferior, debido posiblemente a que la fuente de energía no daba una intensidad constante; ésta era muy alta hacia el final de la corrida, por lo que la velocidad de migración de las proteínas era mucho mayor al final que al principio. No obstante, utilizando fuente de energía con intensidad constante, el problema no se solucionó.

Se decidió entonces variar la cantidad de muestra aplicada, y se observó que con una cantidad de proteína menor, las bandas de la parte superior del gel casi desaparecían, o desaparecían totalmente; sin embargo el "barrido" de la parte inferior empezaba a resolverse en bandas definidas. Esto se puede apreciar en la Figura 8.

Una vez establecida la cantidad adecuada de proteína (150-300 μ g) que se debía aplicar para obtener buena resolución en la parte inferior del gel, se varió nuevamente la concentra-

FIGURA 8

Albúminas y globulinas en geles de acrilamida



A = albúminas B = globulinas ' indica nixtamalizada

[] indica concentración de proteína

→ indica modificación

ción de acrilamida. Se probaron varios gradientes, hasta encontrar el óptimo para cada una de las diferentes fracciones proteínicas. En las Figuras 8 y 9 se observa que las proteínas de todas las fracciones caen dentro de los mismos límites de pesos moleculares y se resuelven adecuadamente en gradientes de 10-20%.

Las Figuras 8, 9, 10 y 11 ilustran los cambios ocurridos en las diferentes fracciones proteínicas durante el proceso de nix tamalización.

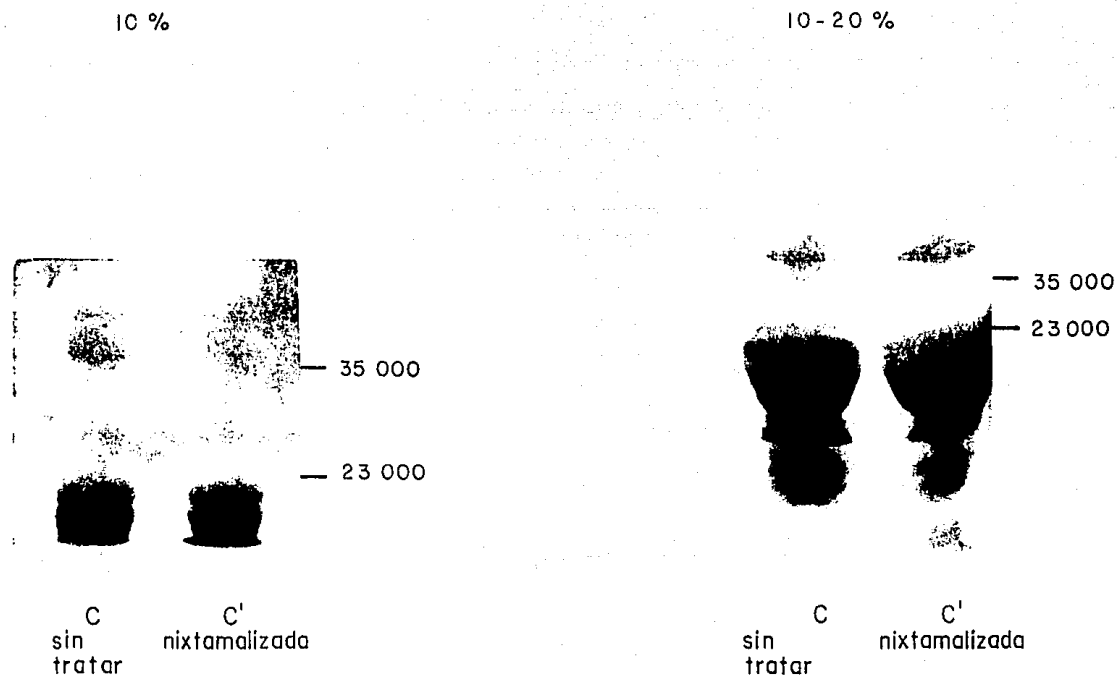
En la Figura 10 se observa el patrón electroforético de varias proteínas con diferentes pesos moleculares en las condiciones experimentales usadas. El gradiente de concentración de acrilamida de 10-20% logra resolver, al igual que un gel de 10%, los límites de pesos moleculares de 0 a 100,000 daltones.

La fracción proteínica que presentó mayor cantidad de bandas fue la de las albúminas (aproximadamente 40 bandas), siguiendo en número las globulinas. Las prolaminas son las que pre sentaron menor cantidad de bandas.

La fracción de albúminas es la que sufrió mayores cambios después del proceso de nix tamalización. Los cambios que sufren las globulinas son relativamente pocos, aunque sí hay desapa

FIGURA 9

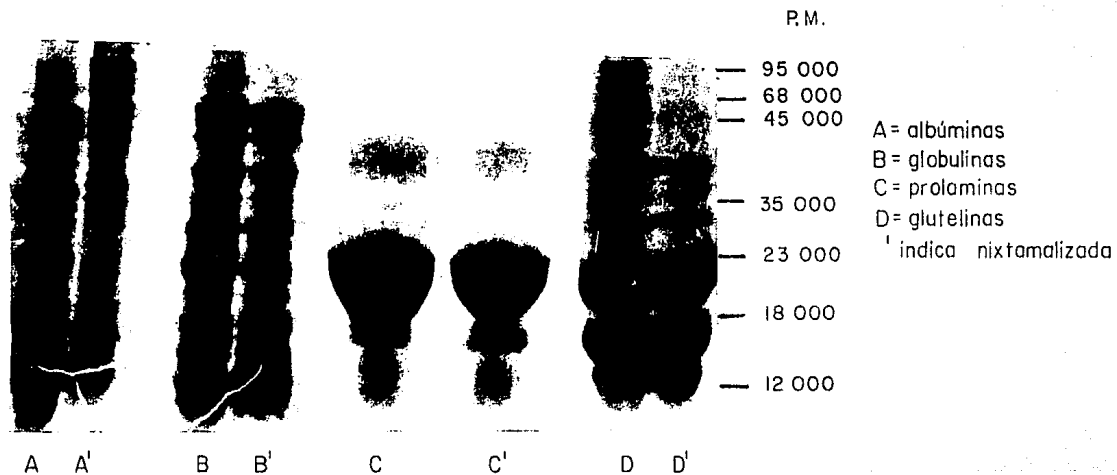
Prolaminas en geles de acrilamida



concentración de proteína 150 μ g

FIGURA 10

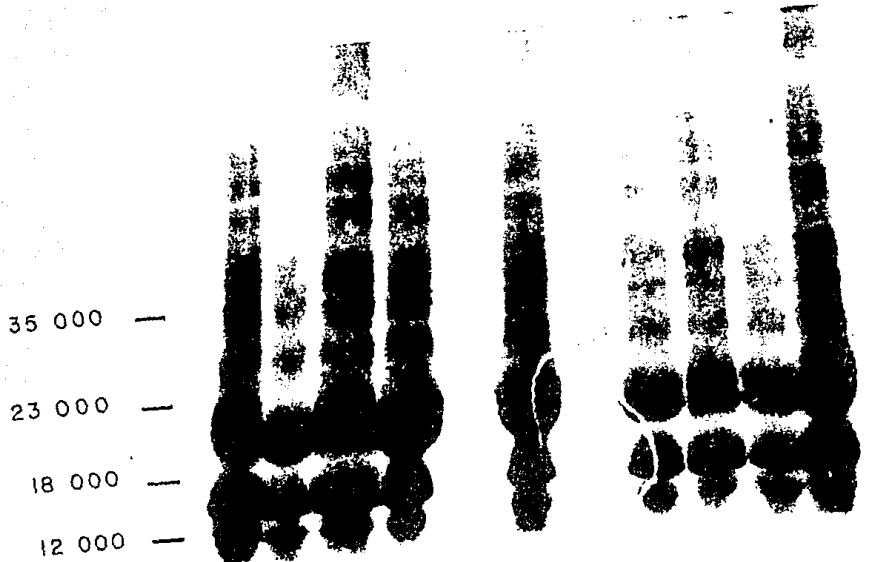
Fracciones proteicas del maíz antes y después de la nixtamalización
en gel de acrilamida 10-20 %



concentración de proteína 150 μ g

FIGURA 11

Glutelinas en gel de acrilamida 10-20 %



D = solubles
E = insolubles
' indica nixtamalizada

D D' D D' D' E' E E' E
concentración de proteína 150 µg

rición de algunas bandas en la zona comprendida entre 15,000 y 20,000 daltones y en las de peso molecular elevado (Ver Figuras 8 y 10). En la Figura 8 se aprecian las protefínas de peso molecular elevado que pasan desapercibidas cuando se aplica una cantidad menor de muestra. (En este gel se presentan albúminas y globulinas aplicadas a una concentración de 150 y 300 μg).

Las prolaminas no cambiaron su patrón electroforético después del tratamiento térmico-alkalino. La Figura 9 muestra la separación de esta fracción en diferentes componentes que no se lograron apreciar cuando la concentración de acrilamida fue constante (10%). Las glutelinas de maíz sin tratar y de maíz nix tamalizado, son idénticas electroforéticamente (Figura 11). En esa misma figura se aprecia que las glutelinas solubles e insolubles corresponden a la misma fracción.

ANALISIS DE AMINOACIDOS.

En el Cuadro 11 se presenta el contenido de aminoácidos detectados en las proteínas del maíz H-28 F-2 y opaco-2 antes y después de la nixtamalización. En ese cuadro se observa que la relación de leucina/isoleucina permanece prácticamente constante después de la nixtamalización. Esta relación es en el maíz H-28 F-2 de 3.27 en el maíz sin tratar y de 3.70 en el nixtamalizado; en el maíz opaco-2 sin tratár dicha relación es de 2.77 mientras

CUADRO 11. ANALISIS DE AMINOACIDOS.

	g DE AMINOACIDO/16 g DE NITROGENO			
	MAIZ H-28 F-2		MAIZ OPACO-2	
	SIN TRATAR	NIXTAMALIZADO	SIN TRATAR	NIXTAMALIZADO
Metionina	1.57	0.61	0.85	1.13
Triptofano	0.73	0.85	-	-
Lisina	1.91	1.90	3.37	3.55
Isoleucina	2.45	2.16	2.61	3.07
Leucina	8.00	8.00	7.24	8.36
Fenilalanina	3.32	3.34	3.25	3.92
Valina	2.89	2.57	3.48	4.64
Treonina	1.89	2.53	2.98	3.40
Cisteína	0.03	0.66	1.09	0.46
Tirosina	1.76	1.34	1.66	1.27
Acido Aspártico	3.27	5.99	4.48	4.03
Acido Glutámico	12.65	13.44	18.11	12.21
Glicina + Alanina	5.14	5.53	7.89	9.23
Prolina	5.70	5.67	6.49	7.86
Serina	1.60	2.81	3.25	3.39
Histidina	1.90	1.93	3.34	3.69
Arginina	2.73	2.75	4.80	5.34
Lisinoalanina	0	0	0	0
Relación Leu/Ileu	3.27	3.70	2.77	2.72

que en el nixtamalizado es de 2.72.

Además de detectar de manera global algunos de los posibles cambios cuantitativos en los aminoácidos de la proteína del maíz nixtamalizado, se pretendía determinar si el tratamiento térmico alcalino dió como resultado la formación de lisinoalanina. La separación del patrón de LAL fue excelente, saliendo de la columna justo antes que la lisina, pero perfectamente separado.

El aminograma del maíz H-28 F-2 nixtamalizado presentó una pequeñísima protuberancia en la línea de base exactamente en el sitio donde se esperaba la elución de LAL; sin embargo, el tamaño de dicho pico fue casi despreciable, por lo que para corroborar si se trataba efectivamente del aminoácido, o si era simplemente la línea de base, se aumentó la sensibilidad del aparato 8 veces en el momento en que se esperaba la aparición de LAL. Se observó que a pesar de dicho aumento en la sensibilidad del aparato, se trataba únicamente de ruido de fondo.

De igual manera, el aminograma del maíz opaco-2 nixtamalizado no presentó pico para LAL.

Debido a la naturaleza de la unión entre la lisina y la dehidroalanina, es difícil pensar que la LAL haya sido hidrolizada durante el tratamiento ácido previo al análisis de aminoácidos.

Sin embargo la cromatografía en capa fina corroboró que la LAL no se hidrolizó durante el tratamiento ácido.

PRUEBAS BIOLÓGICAS.

Una vez transcurridos los 14 días que duró el experimento, se procedió a pesar a las ratas y determinar la cantidad de alimento ingerido. El peso inicial de las ratas, su ganancia de peso y la cantidad de proteína consumida se muestran en el Cuadro 12. Con esos datos se calculó la relación de eficiencia proteínica (REP).

Como se observa en el Cuadro 12, la prueba F de rango múltiple aplicada a los resultados obtenidos del estudio del REP, indica que no existe diferencia significativa al nivel del 1% ni al de 5% de confiabilidad entre las cinco diferentes dietas suministradas a las ratas.

CUADRO 12. RELACION DE EFICIENCIA PROTEINICA.

DIETA	PESO INICIAL (g)	GANANCIA EN PESO (g)	PROTEINA CONSUMIDA (g)	REP ± σ
I Maíz ST	289.0 \bar{x} = 48.17	11.25	7.64	1.48 ± 0.38
II Maíz ST*	289.1 \bar{x} = 48.18	18.93	10.21	1.85 ± 0.39
III Maíz cocido	288.8 \bar{x} = 48.13	11.92	9.17	1.28 ± 0.22
IV Maíz NIXT	288.9 \bar{x} = 48.15	7.6	7.11	1.08 ± 0.59
V Maíz NIXT*	288.8 \bar{x} = 48.13	12.23	9.00	1.37 ± 0.76

$$\text{REP} = \frac{\text{Ganancia de peso}}{\text{Proteína consumida}}$$

* Indica que se suplemento con lisina (1.096%), triptofano (0.118%), isoleucina (0.288%) y metionina (0.346%).

DISCUSION

El proceso de nixtamalización al que se sometió el maíz H-28 F-2 dió como resultado la eliminación de 6.36% de sólidos (equivalentes a 0.2 g de proteína cruda por 100 g de maíz) (Figura 7) en nejayote y agua de lavado. Bressani y colaboradores (1958), Elías y Bressani (1971) y Trejo y Wild (1976) reportaron una disminución en el contenido de vitaminas, minerales, nitrógeno, extracto etéreo y fibra cruda al ser sometido el maíz a tratamiento térmico-alkalino. La pérdida física de los componentes del maíz depende en gran parte de las condiciones de nixtamalización utilizadas, las cuales pueden variar en tiempo (de 15 minutos a una hora de cocimiento y de 8 a 14 horas de reposo) y en concentración de cal (hasta 2%). Bressani y colaboradores (1958) reportaron diferencias entre 5.3 y 14.2% en las pérdidas de sólidos al efectuar la nixtamalización sobre el mismo maíz, personas distintas, quienes variaron la concentración de cal entre 0.17 y 0.58% y el tiempo de cocimiento entre 40 y 67 minutos, según sus costumbres personales.

En este trabajo, en el que las condiciones de nixtamalización utilizadas fueron extremas (2% de cal y 14 horas de reposo), se detectó una pérdida mínima en el nejayote y agua de lavado comparada con las reportadas por Bressani. Es posible que

la eliminación física de algunos componentes del grano del maíz nixtamalizado dependa en parte del método de lavado utilizado.

La cantidad de nitrógeno que se pierde en el nejayote y agua de lavado fue bastante pequeña como para provocar diferencias estadísticamente significativas en cuanto al contenido total de proteína cruda entre el maíz ST y el maíz NIXT (Cuadro 8). Sin embargo, al fraccionar las proteínas del maíz de acuerdo a su solubilidad y determinar diferencias cuantitativas entre aquéllas extraídas del maíz sin tratar y del maíz nixtamalizado, se observó que la cantidad de albúminas y globulinas nixtamalizadas fue menor que la de las extraídas a partir de maíz ST (Cuadro 10). Por lo tanto, es posible que el nitrógeno detectado en el nejayote provenga de estas dos fracciones. Sin embargo también existe la posibilidad de que esta diferencia cuantitativa detectada en la fracción de albúminas y globulinas se deba a cambios en la solubilidad de las proteínas producidos por el tratamiento alcalino al que fueron expuestas, disminuyendo así la cantidad de proteína extraíble por medio de agua y NaCl después de la nixtamalización.

La nixtamalización no produjo diferencias cuantitativas en las prolaminas y glutelinas (Cuadro 10); estas fracciones proteínicas constituyen aproximadamente el 50 y el 30% respectivamente, de las proteínas del maíz. Las diferencias cuantitativas

observadas en albúminas y globulinas son, por lo tanto, mínimas y prácticamente despreciables al considerarse la proteína total del grano entero; esta observación está de acuerdo con el hecho de que no se detectó diferencia significativa entre el contenido de proteínas de las harinas tratada y sin tratar (Cuadro 8).

Con el objeto de determinar si el tratamiento alcalino produjo modificaciones en las proteínas del maíz a nivel cualitativo, se compararon los patrones electroforéticos de las diferentes fracciones proteínicas del maíz nixtamalizado con las del maíz que no fue tratado. Es interesante el hecho de que al igual que lo observado con la determinación cuantitativa, las únicas fracciones aparentemente afectadas fueron las albúminas y las globulinas; los patrones electroforéticos de prolaminas y glutelinas no cambiaron (Figuras 8 a la 11).

El tratamiento térmico-alcalino puede provocar, entre otras reacciones, la hidrólisis de los enlaces peptídicos, dando como resultado péptidos de menor peso molecular. Esta hidrólisis se manifestó principalmente en las albúminas (Figuras 8 y 10), siendo las proteínas de peso molecular entre 12,000 y 25,000 las más afectadas. Con la nixtamalización desaparecieron algunas bandas correspondientes a proteínas de peso molecular entre 15,000 y 20,000. Esto puede indicar que las proteínas se hidrolizaron dando como resultado péptidos más pequeños, o tal vez aminoácidos,

los cuales posiblemente se eliminaron en el nejayote y agua de lavado; también se pudieron haber perdido durante la diálisis que se efectuó, antes de la concentración y liofilización, durante la extracción de las proteínas.

El patrón electroforético de las albúminas también se vió modificado en la zona de pesos moleculares superiores a 70,000 daltones. Es posible que el tratamiento alcalino haya provocado reacciones de adición, trayendo como consecuencia la unión de dos o más proteínas o péptidos a través de cadenas laterales de residuos de aminoácidos tales como cisteína, lisina e histidina. La desaparición de las bandas en la zona de 15,000 a 20,000 daltones podría explicarse por estas reacciones de adición. La generación de proteínas de peso molecular elevado también podría atribuirse al calcio adicionado con la cal, el cual tiene la capacidad de aglomerar proteínas, particularmente albúminas.

Las globulinas, por el contrario, no presentan cambios tan radicales; se trata únicamente de la desaparición, muy probablemente por hidrólisis, de unas cuantas bandas en la zona de 20,000 daltones.

El hecho de que se hayan observado diferencias por medio de geles de acrilamida únicamente en albúminas y globulinas después del tratamiento térmico-alcalino, no significa que no

existen diferencias cualitativas en las prolaminas y glutelinas, ni que las detectadas en albúminas y globulinas sean las únicas. Es muy probable que las condiciones de calor y pH elevado hayan provocado la desnaturalización de las proteínas; sin embargo, la técnica de electroforesis empleada en este trabajo utiliza reactivos tales como β -mercaptoetanol y DSS, los cuales impiden determinar cambios en las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas.

Las glutelinas corresponden a una fracción proteínica cuyo peso varía entre 10,000 y 1,000,000 de daltones; este límite tan amplio en el peso molecular se debe a la gran variabilidad en su contenido de enlaces disulfuro, los que le imparten una estructura tridimensional. El tratamiento alcalino de la nixtamalización muy probablemente causó una modificación de esta red tridimensional, la cual no pudo ser detectada debido al β -mercaptoetanol utilizado tanto en la electroforesis como en la extracción de esta fracción proteínica de glutelinas.

En este trabajo se llevó a cabo el análisis de aminoácidos con el objeto de determinar si el tratamiento térmico-alcalino al que es sometido el maíz durante el proceso de nixtamalización, da como resultado la formación de lisinoalanina. En 1969 de Groot y Slump encontraron LAL en proteína de soya que ha

bía sido tratada a un pH de 12.2 que es el pH que se obtiene en el nejayote después de 14 horas de reposo del grano. Chu y colaboradores (1976) observaron la formación de LAL en maíz tratado con álcali (NaOH, Ca [OH]₂ y KOH) pero bajo condiciones diferentes a las de nixtamalización. Sanderson y colaboradores (1978) encontraron el nuevo aminoácido en masa y tortillas preparadas en el laboratorio usando condiciones de nixtamalización distintas de las tradicionales. Sternberg y colaboradores (1975a) encontraron LAL en tortillas y masa comercial. Sin embargo, en este estudio no se detectó lisinoalanina. La posibilidad de que este aminoácido se encontrara en el maíz nixtamalizado en cantidades muy bajas se eliminó aumentando la sensibilidad del aparato, ya que algunos investigadores encontraron LAL en muy pequeñas proporciones: Sanderson y colaboradores (1978) detectaron en 100 g de proteína de maíz, 0.081 g de LAL, Sternberg y colaboradores (1975a), 0.020 g; Tovar y Carpenter (1982), 0.045 g. Estos datos son del mismo orden de magnitud que la cantidad de cisteína (0.046 g/100 g de proteína) que sí fue detectada en el analizador.

Provansal y colaboradores (1975) encontraron que la LAL se destruye parcialmente al someter proteína de soya a un tratamiento alcalino severo (NaOH 1N a 80°C durante 16 horas). Friedman y colaboradores (1981a) encontraron que la LAL es inestable en álcali; su formación va en aumento al incrementarse el pH

hasta aproximadamente 12.5, punto a partir del cual empieza su destrucción. La destrucción de lisinoalanina está también en función del tiempo. Por lo tanto, es muy posible que sí se haya formado LAL en el maíz durante el tiempo de cocción, pero que las 14 horas de reposo en la solución alcalina a pH 12.2, hayan provocado su destrucción.

Finley y colaboradores (1978) reportaron que añadiendo mercaptoaminoácidos al medio alcalino, estos reaccionan rápidamente con las moléculas de dehidroalanina formadas, evitando su reacción con el ξ amino de la lisina y por lo tanto la formación de LAL. La velocidad de reacción de los grupos SH aumentan rápidamente con pH (Friedman *et al*, 1965). Existe la posibilidad de que debido a la nixtamalización se hayan liberado moléculas de cisteína o cistina las cuales, en el caso de no haber sufrido una β -eliminación, pudieron haber funcionado como inhibidores competitivos de la formación de LAL. La velocidad de las reacciones de β -eliminación depende del aminoácido que se encuentre unido a cisteína.

Una de las limitantes principales del maíz es la de su bajo contenido de lisina. En 1964 Mertz y Bates introdujeron un híbrido - el maíz opaco 2 - cuyo contenido de lisina es 69% superior al del maíz normal. Debido a que la lisinoalanina tiene co-

mo uno de sus precursores a la lisina, resulta lógico suponer que al utilizar un maíz con mayor cantidad de este aminoácido, la probabilidad de formación de LAL causada por la nixtamalización también se incrementa, ya que la posibilidad de encontrar una molécula de lisina distribuída espacialmente en una posición cercana a una de dehidroalanina aumenta. Es por ello que se llevó a cabo el estudio de la nixtamalización del maíz opaco-2. Los resultados fueron los mismos que para el H-28 F-2: no se detectó lisinoalanina (Cuadro 11).

Este resultado es importante, ya que en caso de que se formara LAL, no sólo se estaría desperdiciando una de las principales ventajas del opaco-2 (la lisinoalanina no es aprovechada como lisina más que en un 35% por pollos y sólo 4% por ratas - Friedman - comunicación personal), sino que se estaría introduciendo un nuevo aminoácido cuya toxicidad aún está en discusión (Gould y Mac Gregor, 1977). Algunos investigadores han reportado una relación simple y directa entre la nefrocitomegalia y LAL (de Groot *et al*, 1976a y b; de Gould y Mac Gregor, 1977); mientras que otros no encuentran esta relación (Reyniers *et al*, 1974; Woodard y Alvarez, 1967; Woodard, 1969; Woodard y Short, 1973; Newberne y Young, 1966). Además, es muy posible que la toxicidad de LAL esté limitada a ratas como única especie (O'Donovan, 1976; de Groot *et al*, 1976a). Van Beek y colaboradores (1974) han

postulado que ni la lisinoalanina ni el tratamiento alcalino son los responsables de la toxicidad de las dietas, sino que ésta se debe a un exceso de fósforo. El efecto nocivo de este mineral puede ser reducido aumentando el contenido de calcio de las dietas. Con la nixtamalización, el incremento de calcio en el maíz es aproximadamente 600 mg/kg (Trejo y Wild, 1976), lo que eliminaría la posibilidad de nefrocitomegalia causada por falta de calcio.

Los análisis de aminoácidos que se llevaron a cabo en este trabajo, tenían por objeto determinar la presencia de lisinoalanina, por lo que se realizó un análisis inicial sobre cada una de las muestras y se aumentó la sensibilidad del aparato en una segunda determinación. Por lo tanto se obtuvo únicamente un aminograma completo para cada una de las cuatro harinas de maíz analizadas. Después de la determinación de LAL, estos aminogramas se compararon entre sí, tomando en cuenta las variaciones atribuibles al método (Bourges, comunicación personal). Sin embargo, no fue posible determinar si existe diferencia entre el contenido de cada uno de los aminoácidos del maíz nixtamalizado con respecto al que no fue tratado debido al escaso número de datos con los que se cuenta y al hecho de que los cambios observados en el maíz H-28 F-2 y en el maíz opaco-2, fueron contrarios en varios casos.

De manera global se podría decir que no se detectaron modificaciones en el patrón de aminoácidos de las proteínas del maíz sin tratar con respecto a las del nixtamalizado. La relación leucina/isoleucina del maíz sin tratar que es aproximadamente 2 veces superior a la considerada como óptima (7:4), permanece prácticamente constante después de la nixtamalización (en el maíz H-28 F-2 es de 3.27 en el maíz sin tratar y de 3.70 en el nixtamalizado, mientras que en el opaco-2, estas relaciones son de 2.77 y 2.72, respectivamente); el contenido de la mayoría de los aminoácidos parece, en términos generales, también permanecer invariante.

A pesar de que las pruebas químicas y bioquímicas demostraron que existen muy pocas diferencias entre las proteínas del maíz nixtamalizado y las del maíz que no fue tratado, que pudieran provocar un cambio en el valor nutritivo, se efectuó una prueba de eficiencia proteínica ya que las proteínas podrían haber sufrido alguna transformación que no había sido detectada por las técnicas analíticas empleadas.

El análisis estadístico de los resultados del estudio de REP utilizando los 5 diferentes tratamientos, muestra que no existe diferencia significativa a nivel de 1% ni al de 5% de confiabilidad (Cuadro 12). Esto indica que la calidad de la proteí-

na de maíz aparentemente no se ve afectada por el tratamiento térmico-alcalino al que es sometido el grano durante la nixtamalización.

Las razones para haber utilizado 5 tratamientos y no los 2 únicos usados a lo largo de todo el estudio son las siguientes:

1. Al comparar el resultado de las pruebas biológicas obtenido con las dietas I y IV, se estarían determinando únicamente los cambios en la calidad de la proteína provocados por el tratamiento térmico-alcalino.
2. En caso de existir diferencia entre los tratamientos I y IV resultando éste mejor que aquél (como había propuesto Bressani, 1958), no se podría afirmar si la causa del incremento en el REP había sido el tratamiento térmico-alcalino o únicamente el tratamiento térmico que estaría provocando una gelatinización del almidón. Con el fin de determinar si este aumento se debía exclusivamente al cocimiento, se incluyó la dieta III.
3. Debido a la conocida deficiencia del maíz en los aminoácidos indispensables lisina, triptofano, isoleucina y metionina, resultaba evidente que el REP obtenido con las dietas I, III y

IV sería muy bajo en relación al de caseína, considerado como óptimo. Por ello se incluyeron las dietas II y V en las que se suplementó el maíz con dichos aminoácidos.

El hecho de no haber encontrado diferencias significativas entre los tratamientos que fueron suplementados con aminoácidos (II y V) y los que no lo fueron (I y IV) parece indicar que la cantidad de aminoácido agregado (lisina, 1.096%; triptofano, 0.118%; isoleucina, 0.288% y metionina, 0.346%), no fue suficiente como para provocar un aumento en el REP. Existe gran controversia entre los requerimientos mínimos diarios por estos aminoácidos (Said y Hegsted, 1970).

Los resultados de la prueba biológica utilizada indican que no existe variación en la calidad de la proteína después del tratamiento térmico-alkalino del maíz. La eficiencia de la utilización de una proteína depende de la capacidad que tiene una cantidad mínima de esa proteína de proporcionar los aminoácidos indispensables requeridos por un estado fisiológico particular. Los datos obtenidos con el REP, no pueden aún ser concluyentes ya que la nixtamalización pudo haber provocado cambios tanto positivos como negativos simultáneamente anulando así su efecto. A continuación se propone una de esas posibilidades:

Podemos suponer que el tratamiento térmico-alcalino ha ya provocado cambios conformacionales en las proteínas, dando como resultado diferencias en la accesibilidad de las enzimas proteolíticas.

Así, la digestibilidad de las proteínas del maíz nixtamalizado puede ser diferente que aquella de las del maíz no tratado. El hecho de que la zeína (cuyo contenido de leucina es muy alto), se hiciera indigerible o por lo menos de difícil digestión, traería como resultado un efecto benéfico, ya que la leucina estaría disminuyendo proporcionalmente. Sin embargo, también existe la posibilidad de que algunos aminoácidos indispensables, como la isoleucina por ejemplo, hubieran sufrido racemización. En este caso, a pesar de que la relación leucina/isoleucina haya sido mejorada, el desequilibrio entre las formas "L" de esos aminoácidos, provocaría que la ganancia lograda con la baja en la digestibilidad de la zeína, resultara intrascendente.

Este ejemplo ilustra la importancia de continuar analizando cada uno de los factores que podrían contribuir a una diferencia en la calidad de las proteínas del maíz nixtamalizado. Para ello, sería necesario hacer pruebas de digestibilidad tanto *in vitro* como *in vivo* acompañadas de estudios de racemización de aminoácidos. Es muy posible que las nuevas proteínas formadas,

debido a reacciones de adición entre los grupos laterales de sus aminoácidos sean más resistentes al ataque por proteasas, conduciendo así, a una disminución en su utilización. La tripsina cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos derivados de los grupos carboxilo de los residuos de arginina y de lisina; el álcali puede transformar la lisina en lisinoalanina y degradar a la arginina causando así una disminución en la susceptibilidad de ataque de esta enzima. La quimotripsina por su lado, cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos adyacentes a los grupos carboxilo de los aminoácidos aromáticos y en menor grado, de los residuos de leucina, isoleucina y metionina. La nixtamalización pudo haber provocado racemización de estos aminoácidos y por lo tanto, resistencia al ataque proteolítico (Hayashi y Kameda, 1980b; Friedman *et al*, 1981).

Sería importante llevar a cabo otros estudios con el objeto de detectar la formación de nuevos aminoácidos, así como determinar su posible toxicidad. Una prueba de REP a 14 días como la que se realizó en este estudio, difícilmente mostraría efectos toxicológicos; para ello se requeriría efectuar las pruebas biológicas por períodos más prolongados, seguidos de exámenes de los órganos y análisis histológicos de los mismos.

Las condiciones bajo las cuales se realiza la nixtamalización podrían ser un factor importante desde el punto de vista

de la nutrición. Un ejemplo de ello es el efecto que sobre los aminoácidos tiene el tiempo de exposición a soluciones alcalinas; así, a mayor tiempo se logra una disminución en el contenido de lisinoalanina formada, pero se aumenta la proporción de aminoácidos racemizados. Sería conveniente realizar estudios con diferentes concentraciones de cal y a diferentes tiempos de calentamiento y de reposo. De esta manera se podrían encontrar las condiciones óptimas requeridas para obtener el mejor valor nutritivo del maíz.

En México, el mexicano promedio consume aproximadamente 350 g de maíz nixtamalizado diariamente. El ahondar en el estudio de este alimento básico podría contribuir a mejorar la alimentación de nuestro pueblo.

BIBLIOGRAFIA

AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists) 14.018. Horwitz, W. editor. 11a. Edición. Washington, D.C., 1970a.

AOAC (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists) 14.026. Horwitz, W., editor. 11a. Edición. Washington, D.C., 1970b.

Asquith, R.S., Booth, A.K. y Skinner, J.D. (1969). *Biochim. Biophys. Acta.* 181:164.

Asquith, R.S. y Carthew, P. (1972). *Biochim. Biophys. Acta.* 278:8.

Bader, M.E. (1980). *Chem. Eng.* 6:123.

Bohak, Z. (1964). *J. Biol. Chem.*, 239:2878.

Bressani, R., Paz y Paz, R. y Scrimshaw, N.S. (1958). *J. Agric. and Food Chem.*, 6(10):770.

Bressani, R. y Scrimshaw, N.S. (1958). *J. Agric. and Food Chem.*, 6(1):774

Bressani, R., Wilson, D., Chung, M., Behar, M. y Scrimshaw, N.S. (1963). *J. Nutrition*, 80:80.

Bressani, R., Elías, G. y Braham, J.E. (1968). *Arch. Latinoam. Nut.* 18:123.

- Bressani, R., Braham, J.E. y Behar, M. editores. Mejoramiento Nutricional del Maíz. INCAP. Guatemala (1972).
- Chu, N.T., Pellet, P.L. y Nawar, W.W. (1976). J. Agr. and Food Chem., 24(5):1084.
- Cravioto, R.O., Massieu, H.G., Cravioto, O.Y. y Figueroa, F. de M. (1952). J. Nutrition, 48:456.
- Davis, B.J. (1964). Disc Electrophoresis II -Methods and Application to Human Serum Proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:404.
- Duncan, D.B. (1955). Biometric, 11:1.
- Elías, L.G. y Bressani, R. Trabajo presentado en el II Congreso de Tecnología de Alimentos, en México; 18-19 de marzo de 1971.
- FAO/OMS. Necesidades de Energía y Proteínas. Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos No. 522 y FAO: Reuniones sobre Nutrición. Informe No. 52. Roma, 1973.
- Finley, J.W. y Friedman, M. Protein Crosslinking: Nutritional and Medical Consequences. Friedman, M. editor. Plenum Press. Nueva York (1977).
- Finley, J.W., Snow, J.T., Johnston, P.H. y Friedman, M. (1978). J. Food Sci., 43:619.
- Friedman, M., Cavins, J.F. y Wall, J.S. (1976). J. Amer. Chem. Soc., 87:3672.
- Friedman, M. Protein Crosslinking: Nutritional and Medical Consequences. Friedman, M. editor. Plenum Press. Nueva York (1977).

Friedman, M., Zahnley, J.C. y Masters, P. (1981). J. Food Sci. 46:127.

Glick, D. Techniques in Histo- and Citochemistry. Interscience. Nueva York (1949).

Gopalan, C. y Kamala, S.J.R. (1975). Vitamins and Hormones, 33:505.

Gould, D.H. y Mac Gregor, J.T. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 86 B. Friedman, M., editor (1977).

de Groot, A.P. y Slump, P. (1969). J. Nutrition, 98:45.

de Groot, A.P., Slump, P., Feron, V.J. y Van Beek, L. (1976a). J. Nutr., 106:1527.

de Groot, A.P., Slump, P., Van Beek, L. y Feron, V.J. Evaluation of Proteins for Humans. Bodwell, C.E., editor. AVI Publishing Co., Westport, C.T. (1976b).

Gross, E. y Morell, J.L. (1971). J. Am. Chem. Soc. 93:4634.

Gross, E. Advances in Chemistry Series No. 160. Improvement through Chemical and Enzymatic Modification. Freney, R.E. y Whitaker, J.R., editores. Washington, D.C. (1977).

Hansel, L.W., Tsai, C.Y. y Nelson, O.E. (1973). Cereal Chem., 50:383.

Harper, A.E., Punekar, B.D. y Elvehjam, C.A. (1958). J. Nutr. 66:163.

Hayashi, R. y Kameda, I. (1980a). Agric. Biol. Chem., 44(1):175.

Hayashi, R. y Kameda, I. (1980b). *Agric. Biol. Chem.*, 44(4):895.

Horn, M.J., Jones, D.B. y Ringel, S.J. (1940). *J. Biol. Chem.*, 138:141.

Hurrell, R.F. y Carpenter, K.J. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 86 B. Friedman, M., editor (1977).

Katz, S.H., Hediger, M.L. y Valleroy, L.A. (1974). *Science*, 184: 765.

Kodicek, E., Braude, R., Kon, S.K. y Mitchell, K.G. (1959). *Brit. J. Nutr.*, 13:363.

Laemmli, U.K. (1970). *Nature*, 227:680.

Laguna, J. y Carpenter, K.J. (1951). *J. Nutrition*, 45:21.

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193:265.

Lucas, B. y Sotelo, A. (1980). *Anal. Biochem.*, 109:192.

Lucas, B. y Sotelo, A. Aceptado para publicación en *Anal. Biochem.* (1982).

Lungu, N. *Mejoramiento Nutricional del Maíz*. 219:226. Bressani, R., Braham, J.E. y Béhar, M., editores. INCAP. Guatemala (1972).

Mangelsdorf, P.C., Mac Neish, R.S. y Galinat, W.C. (1964). *Science*, 143:538.

Mc Pherson, C.M., Ou, S.Y. (1976). J. Food Sci., 41:1301.

Mertz, T.E. y Bates, L.S. (1964). Science, 145:279.

Moore, S. y Stein, H. Methods in Enzymology. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O., editores. Vol. 6, 819-831. Academic Press. Nueva York (1963).

Nashef, A.S., Osuga, D.T., Lee, H.S., Ahmed, A.I., Whitaker, J.R. y Freeney, R.E. (1977). J. Agric. Food Chem., 25(2):245.

National Academy of Sciences - National Research Council. Recommended Daily Dietary Allowances. Food and Nutrition Board. Revised 1974. Washington, D.C.

National Lime Association. Chemical Facts. Bulletin 214. 3a. Edición, p. 23-25. Washington, D.C. (1973).

Newberne, P.M. y Young, V.R. (1966). J. Nutr. 89:69.

Nielsen, H.C., Paulis, J.W., James, C. y Wall, J.S. (1970). Cereal Chem., 47:501.

O'Donovan, C.J. (1976). Fd. Cosmet. Toxicol., 14:483.

Osborne, T.B., Mendel, L.B. y Ferry, E.L. (1919). J. Biol. Chem., 37:223.

Patchornik, A. y Sokolovsky, M. (1964). J. Am. Chem. Soc., 86: 1860.

Paulis, J.W., James, C. y Wall, J.S. (1969). J. Agr. Food Chem., 17(6):1301.

Paulis, J.W., Bietz, J.A. y Wall, J.S. (1975). Agric. and Food Chem., 23(2):197.

Pearson, D. Laboratory Techniques in Food Analysis, p. 52. John Wiley and Sons. Nueva York (1973).

Pradilla, A., Harpstead, D.D., Linares, F.A. y González Diest, C.E. Mejoramiento Nutricional del Maíz. 126-133. Bressani, R., Braham, J.E. y Béhar, M., editores. INCAP. Guatemala (1972).

Provansal, M.M.O., Cuq, J.L.A. y Cheftel, J.C. (1975). J. Agric. Food Chem., 23(5):938.

Reyniers, J.P., Woodard, J.C. y Alvarez, M.R. (1974). Lab. Invest. 30:582.

Rodríguez, O.F., Mejoramiento Nutricional del Maíz. 109-125. Bressani, R., Braham, J.E. y Béhar, M., editores. INCAP. Guatemala (1972).

Said, A.K. y Hegsted, D.M. (1970). J. Nutrition., 100:1363.

Sanderson, J., Wall, J.S., Donaldson, G.L. y Cavins, J.F. (1978). Cereal Chem., 55:204.

Shemer, M., Creinin, H.L., Mc Donald, R.E. y Irwin, W.E. (1978). Cereal Chem., 55(3):383.

Spande, T.F., Witkop, B., Degani, Y. y Patchornik, A. (1970). Adv. Protein Chem., 24:97.

Speakman, J.R. y Whewell, C.S. (1936). J. Soc. Dyers Colourists, 52:380.

Sternberg, M., Kim, C.Y., y Schwende, F.J. (1975a). Science, 992.

Sternberg, M., Kim, C.Y. y Plunkett, R.A. (1975b). J. of Food Science, 40:1168.

Tovar, L.R. y Carpenter, K.J. (1982). Arch. Latinoam. Nutr. En prensa.

Trejo, A. y Wild Altamirano, C. Tortillas de Maíz. Resumen del trabajo presentado al Premio Banamex de Ciencia y Tecnología, 1976.

Van Beek, L., Feron, V.J. y de Groot, A.P. (1974). J. Nutrition, 104-1630.

Wang, D.I.C. Protein Resources and Technology. Milner, M., Scrimshaw, N.S. y Wang, D.I.C., editores. The AVI Publishing Co. Inc., Westport, C.T. (1978).

Watt, B.K. y Merrill, A.C. Composition of Foods. Agriculture Handbook No. 8. USDA. Washington, D.C. (1975).

Weber, K. y Osborn, M. (1969). J. Biol. Chem., 244:440.

Whitaker, J.R. Chemical Deterioration of Proteins, 145:163.

Whitaker, J.R., Fujimaki, M., editores. American Chemical Society. Washington, D.C. (1980).

Woodard, J.C. y Alvarez, M.R. (1967). Arch. Path., 84:153.

Woodard, J.C. (1969). Lab. Invest. 20:9.

Woodard, J.C. y Short, D.D. (1973). J. Nutr., 103:569.

Ziegler, K., Melchert, I. y Lürken, C. (1967). Nature, 214:404.