

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

***RELACIÓN DEL GRADO DE FIJACIÓN DEL CALCIO CON LA
CALIDAD DE LA PROTEÍNA PARA MAÍZ QPM H-368
SOMETIDO A UN TRATAMIENTO TÉRMICO ALCALINO***

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Juana Isela Rojas Molina

TUTOR: Dr. Mario Enrique Rodríguez García

México, D. F.

AÑO: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Ana María Calderón de la Barca
Primer vocal	Dr. Ernesto Moreno Martínez
Segundo vocal	Dra. Magda Carvajal Moreno
Tercer vocal	Dr. Orlando Zelaya Ángel
Secretario	Dr. Juan Manuel Aceves Hernández
Primer suplente	Dra. Carmen Wachter Rodarte
Segundo suplente	Dr. Ricardo Gaitán Lozano

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Físicoquímica de Alimentos del Dr. Mario Enrique Rodríguez García del Departamento de Nanotecnología del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, Campus Juriquilla. Se contó con la colaboración del Laboratorio de Absorción Atómica del Instituto de Geografía, UNAM; del Laboratorio de Microscopía del Instituto de Física, UNAM; del Laboratorio de Neurofarmacología Marina del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla; del Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ y del Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ.

Tutor: Dr. Mario Enrique Rodríguez García

Sustentante: M. en C. Juana Isela Rojas Molina

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
ACRÓNIMOS	iv
GLOSARIO DE TÉRMINOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	
2.1 Descripción del maíz.....	9
2.2.1 Origen del maíz.....	9
2.1.2 Estructuras anatómicas del grano de maíz.....	10
2.1.3 Producción e importancia del maíz en la dieta latinoamericana.....	16
2.1.4 Composición química y valor nutrimental del maíz.....	17
2.1.5 Proteínas del grano de maíz.....	18
2.1.6 Características de las variedades de maíz de alta calidad proteí- nica.....	18
2.2 Proceso de nixtamalización.....	20
2.2.1 Descripción del método tradicional de nixtamalización.....	20
2.2.2 Procesos industriales para la producción de harinas instantáneas.....	21
2.3 Cambios estructurales y en la composición química del grano de maíz sometido al tratamiento térmico alcalino.....	22
2.3.1 Cambios estructurales en el grano de maíz nixtamalizado.....	22
2.3.2 Cambios en la composición química del grano de maíz nixtamali- lizado.....	29
2.4 Modificaciones en las proteínas del maíz nixtamalizado.....	31
2.4.1 Cambios en la solubilidad de las fracciones proteínicas del grano de maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino.....	31
2.4.2 Efecto de la nixtamalización en la calidad de la proteína del	

	Página
maíz nixtamalizado	32
2.4.3 Relación del calcio con la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado.....	35
3. JUSTIFICACIÓN.....	37
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
4.1 Hipótesis.....	39
4.2 Objetivo general.....	39
4.3 Objetivos particulares.....	39
5. METODOLOGÍA.....	41
5.1 Equipo.....	41
5.2 Materiales.....	41
5.3 Material QPM.....	42
 Etapa 1. Caracterización de la materia prima y elaboración de las muestras experimentales	
5.4 Caracterización química del maíz nativo.....	43
5.4.1 Análisis químico proximal.....	43
5.4.2 Contenido de calcio endógeno.....	43
5.5 Contenido de aminoácidos esenciales en el maíz nativo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	44
5.5.1 Preparación de las muestras experimentales.....	45
5.5.2 Hidrólisis de las muestras.....	45
5.5.3 Derivatización de las muestras.....	45
5.5.4 Análisis cromatográfico.....	46
5.5.5 Contenido de triptófano.....	46
5.6 Determinación de la relación endospermo harinoso/endospermo vítreo y dureza en el grano de maíz QPM H-368 nativo.....	47
5.6.1 Contenido de endospermo vítreo y endospermo harinoso.....	47
5.6.2 Dureza del grano.....	48
5.7 Análisis de la morfología del endospermo del maíz nativo por microscopía electrónica de barrido a bajo vacío (LV-SEM).....	48

	Página
5.8 Proceso de nixtamalización.....	49
5.8.1 Determinación del tiempo de cocción del grano de maíz nixtamalizado por el método tradicional.....	49
5.8.2 Contenido de humedad.....	50
5.8.3 pH.....	50
5.8.4 Contenido de calcio en el pericarpio del grano.....	50
5.9 Nixtamalización del grano de maíz.....	51
Etapa 2. Análisis de las modificaciones en las proteínas del maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo	
5.10 Contenido de proteína total.....	53
5.11 Extracción y cuantificación de las proteínas solubles a partir del grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado.....	54
5.11.1 Extracción de las fracciones proteínicas.....	54
5.11.2 Cuantificación del contenido de proteína en las fracciones proteínicas.....	55
5.12 Contenido de lisina y triptófano.....	56
5.13 Contenido de lisina reactiva.....	56
5.14 Contenido de aminoácidos esenciales en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado.....	57
5.15 Digestibilidad de la proteína en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado.....	57
5.16 Análisis estadístico.....	58
Etapa 3. Determinación del contenido de calcio residual, evaluación de las transformaciones en el grado de gelatinización del almidón y morfología del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo.	
5.17 Determinación del contenido de calcio residual en el endospermo total y en diferentes capas del endospermo.....	59
5.18 Grado de gelatinización del almidón en diferentes capas del endospermo por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	59

5.19 Transformaciones morfológicas del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo por LV-SEM....	60
--	----

Etapa 4. Evaluación de la relación entre el contenido de calcio y el contenido de lisina y triptófano en el endospermo del grano de maíz nixtamalizado

5.20 Contenido de proteína en diferentes capas del endospermo del maíz nixtamalizado.....	61
5.21 Contenido de lisina y triptófano en diferentes capas del endospermo del maíz nixtamalizado.....	61
5.22 Correlación entre el contenido de calcio y el contenido de lisina y triptófano en el endospermo del maíz nixtamalizado.....	61

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 62

6.1 Resultados de los objetivos particulares 1 y 2.....	62
6.1.1 Análisis del grano de maíz QPM H-368 nativo.....	62
6.1.2 Contenido de lisina y triptófano (g/100 g proteína) en el maíz nativo por HPLC.....	64
6.1.3 Contenido de endospermo vítreo, endospermo harinoso y dureza en el maíz.....	64
6.1.4 Análisis microestructural del endospermo del maíz nativo por LV-SEM.....	65
6.1.5 Establecimiento de los parámetros cuantitativos para definir el tiempo de cocción del grano durante el proceso de nixtamalización.....	66
6.1.6 Perfiles térmicos del grano de maíz sometido al tratamiento térmico alcalino.....	68

6.2 Resultados del objetivo particular 3.....	70
6.2.1 Contenido de proteína total en el grano de maíz QPM H-368 na	

	Página
tivo y HMN en función del tiempo de reposo.....	70
6.2.2 Perfil de la proteína recuperada en las fracciones proteínicas extraídas a partir del grano de maíz nativo, control y HMN en función del tiempo de reposo.....	71
6.2.3 Contenido de lisina total y lisina reactiva en el grano de maíz QPM H-368 nativo y HMN en función del tiempo de reposo.....	73
6.2.4 Contenido de triptófano en el grano de maíz QPM H-368 nativo y HMN en función del tiempo de reposo.....	76
6.2.5 Contenido de aminoácidos esenciales en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado.....	78
6.2.6 Digestibilidad de la proteína en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado.....	81
6.3 Resultados de los objetivos particulares 4 y 5.....	83
6.3.1 Contenido de calcio residual en el grano de maíz nixtamalizado en forma de harinas.....	83
6.3.2 Contenido de calcio en el endospermo del grano de maíz nixtamalizado.....	85
6.3.3 Análisis del grado de gelatinización del almidón en diferentes capas del endospermo del maíz nixtamalizado por DSC.....	87
6.3.4 Transformaciones morfológicas del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo por LV-SEM.....	89
6.4 Resultados de los objetivos particulares 6 y 7.....	95
6.4.1 Contenido de proteína total en el endospermo periférico e interno del grano de maíz nativo y nixtamalizado.....	95
6.4.2 Modificaciones en el contenido de lisina y triptófano en las capas externas e internas del endospermo del grano de maíz nativo y nixtamalizado.....	96
6.4.3 Relación entre el calcio fijado en el endospermo del grano de	

	Página
maíz nixtamalizado con el contenido de lisina y triptófano.....	98
7. CONCLUSIONES.....	101
8. PERSPECTIVAS.....	103
9. REFERENCIAS.....	104
APÉNDICE I.....	122
Artículo 1.....	123
Artículo 2.....	124
Artículo 3.....	125
Artículo 4.....	126
Artículo 5.....	127

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por las facilidades otorgadas para continuar con mi formación académica.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas e inculcarme un espíritu universitario.

Al CONCyTEQ por el apoyo económico otorgado para el desarrollo del trabajo a través del programa estatal para formación de investigadores y apoyo a proyectos convocatoria 2004.

Al CONACYT por las facilidades económicas concedidas para la culminación del trabajo a través del programa para la formación de doctores convocatoria 2007.

A la M. en C. Leticia Baños del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, por el apoyo en las determinaciones de rayos X.

A la técnica académica Pilar Fernández Lomelín del Instituto de Geografía de la UNAM, por su valiosa asesoría y por compartir su experiencia en las determinaciones de espectroscopía de absorción atómica.

Al técnico académico Roberto Hernández Reyes del Instituto de Física de la UNAM por su paciencia inagotable y sus valiosas sugerencias en las imágenes de microscopía.

A la M. en C. Posidia Pineda Gómez de la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo técnico para los análisis de calorimetría diferencial de barrido.

A los integrantes del jurado, a la Dra. Ana María Calderón de la Barca, al Dr. Ernesto Moreno Martínez, a la Dra. Magda Carvajal Guzmán, al Dr. Orlando Zelaya Ángel, al Dr. Juan Manuel Aceves Hernández, a la Dra. Carmen Wachter Rodarte y al Dr. Ricardo Gaitán Lozano por su tiempo y sus valiosas aportaciones.

DEDICATORIAS

A MI PADRE Y A MI MADRE

“Hay hombres y mujeres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos.

Pero, hay los que luchan toda la vida, éstos son los imprescindibles.”

Bertolt Brecht

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos del Dr. Mario Enrique Rodríguez García del Departamento de Nanotecnología del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, Campus Juriquilla. Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en el 14^º Congreso Latinoamericano de Nutrición efectuado en la ciudad de Florianópolis, Brasil, en el 2^º Congreso Nacional y en el 1^{er}. Congreso Internacional de Nixtamalización “Del maíz a la tortilla”, realizado en la Ciudad de Querétaro, México y en el 4^º Congreso Internacional de Ingeniería llevado a cabo en la Ciudad de Querétaro, México. Así mismo, la mayor parte de los resultados derivados de esta investigación han sido publicados en artículos científicos los cuales se listan a continuación: **1)** Fernández-Muñoz, J.L., **Rojas-Molina, J.I.**, González-Dávalos, M.L., Leal, M., Valtierra, M.E., San Martín-Martínez E. and Rodríguez, M.E. (2004). Study of calcium ion diffusion in components of maize kernels during traditional nixtamalization process. *Cereal Chem.* **81**(1): 65-69. **2)** Hurtado-Castañeda, D., Fernández, J., Gutiérrez, E., **Rojas-Molina, I.**, Fernández-Muñoz, J.L. and Rodríguez, M.E. (2005). The diffusion of calcium ion into the organic layers studied by a differential photoacoustic system. *J. Phys. IV.* **125**: 833-836. **3)** Gutiérrez, E., **Rojas-Molina, I.**, Pons-Hernández, J.L., Guzmán, H., Aguas-Angel, B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios-Fonseca, A., Herrera, G. and Rodríguez, M.E. (2007). Study of calcium ion diffusion in nixtamalized Quality Protein Maize as a function of cooking temperature. *Cereal Chem.* **84**(2): 186-194. **4)** **Rojas-Molina, I.**, Gutiérrez-Cortez, E., Palacios-Fonseca, A., Baños, L., Pons-Hernández, J.L., Guzmán, H., Pineda-Gómez, P. and Rodríguez, M.E. (2007). Study of the structural and thermal changes in the endosperm of Quality Protein Maize during traditional nixtamalization process. *Cereal Chem.* **84**(4): 304-312 y **5)** **I. Rojas-Molina**, E. Gutiérrez, M.E. Cortés-Acevedo, A. Falcón, R. Bressani, A. Rojas, C. Ibarra, J.L. Pons-Hernández, S.H. Guzmán-Maldonado, A. Cornejo-Villegas, and M.E. Rodríguez (2008). Analysis of quality protein changes in nixtamalized QPM flours as a function of the steeping time. *Cereal Chem.* **85**(3): 409-416.

ACRÓNIMOS

Å = Armstrong (unidad de medida equivalente a 1×10^{-12})

AACC = Asociación americana de químicos en cereales (american association of cereal chemists)

AOAC = Asociación oficial de químicos analistas (association of official analytical chemists)

BSA = Seroalbúmina de bovino

°C = Grados centígrados

CA = Capa de aleurona

CIMMYT = Centro de investigación para el mejoramiento del maíz y del trigo

CT = Grano de maíz con tratamiento térmico sin $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ó muestra control

CP = Cuerpos proteínicos

CuK α = Longitud de onda equivalente a 1.540046 Å

DRX = Difracción de rayos X

DSC = Calorimetría diferencial de barrido (differential scanning calorimetry)

E = Endospermo

EAA = Espectrofotometría de absorción atómica

EDS = Espectroscopia de difracción por electrones (electron diffraction spectroscopy)

EMN = Endospermo de maíz nixtamalizado

F = Fibras de celulosa, hemicelulosa y lignina

FAO/OMS/UNU = Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación/ Organización mundial de la salud/ Universidad de la naciones unidas

GA = Gránulo de almidón

GE = Gránulo de almidón en forma esférica

GP = Gránulo de almidón en forma poliédrica

h = Hora(s)

HMN = Harinas de maíz nixtamalizado

HPLC = Cromatografía de líquidos de alta resolución (high-pressure liquid chromatography)

INIFAP = Instituto nacional de investigaciones forestales agrícolas y pecuarias

kg = Kilogramo

kgf = Kilogramo-fuerza

kV = Kilovoltios

λ = Longitud de onda

L = Litro

LAL = Lisinoalanina

LV-SEM = Microscopía electrónica de barrido a bajo vacío (low-vacuum scanning electron microscopy)

mA = Miliamperio

ME = Mercaptoetanol

mg = Miligramo(s)

$\mu\text{g/mL}$ = Microgramo(s)/mililitro

min = Minuto(s)

μL = Microlitros

mL = Mililitros

MP = Matriz proteínica

NC = Grano de maíz crudo ó nativo ó sin procesar

NCCP = Sistema de cocción computarizado con control de temperatura
(nixtamalization computer controlled process)

nm = Nanómetros (1×10^{-9} metros)

NPU = Utilización proteínica neta (net protein utilization)

P = Pericarpio

Pa = Pascal

PITC = Fenilisotiocianato (phenylisothiocyanate)

psi = Libra por pulgada cuadrada (pounds per square inch)

PER = Eficiencia proteínica relativa ó coeficiente de eficiencia proteínica
(protein efficiency ratio)

pH = Potencial de hidrógeno

ppm = Partes por millón (mg/kg)

QPM = Maíz con alta calidad proteínica (quality protein maize)

rpm = Revoluciones por minuto

SDS = Dodecilsulfato de sodio

SA = Subaleurona

SEM = Microscopía electrónica de barrido (scanning electron microscopy)

TEA = Trietilamina

TIA = Asociación de la industria de la tortilla (tortilla industry association)

Torr = mm Hg

UV/vis = Ultravioleta/visible

w/w = peso/peso (weight/weight)

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aminoácidos esenciales: Son aquellos que no pueden ser sintetizados de materiales que normalmente se encuentran en la dieta, a una tasa adecuada para satisfacer las necesidades corporales. Algunos investigadores también les llaman “aminoácidos indispensables”.

Cristalinidad relativa: Valor calculado a partir de un patrón de difracción de rayos X, a partir del cual se calcula el área total bajo la curva del espectro al sustraerle el área bajo la curva correspondiente a los picos con mayor intensidad de difracción.

Digestibilidad de un alimento: Es la porción del nitrógeno del mismo que es absorbida tras su ingesta.

Eficiencia proteínica relativa o Coeficiente de eficiencia proteínica (PER): Es la ganancia en peso (en gramos) por gramo de proteína consumida, en animales de experimentación alimentados con dietas que contengan la proteína a analizar.

Entalpía: Magnitud termodinámica, medida de la cantidad de energía absorbida o cedida por un sistema termodinámico. La cantidad de energía que tal sistema puede intercambiar con su entorno se mide en joules (J).

Fitatos: Compuestos derivados del ácido inositolhexafosfórico $[C_6H_6(OPO(OH)_6)]$ o ácido fítico, el cual es un producto que se encuentra en numerosos cereales que secuestra minerales como el hierro, calcio y zinc, impidiendo su absorción a través del tracto digestivo formando complejos con estos minerales.

Gelatinización: Fenómeno que involucra la fusión, recristalización, templado y la fusión parcial y total de los cristales de amilosa del almidón. El agua actúa como plastificante para disminuir la temperatura de transición vítrea de las regiones amorfas, facilitando la fusión de los cristales de almidón. Se requiere un contenido mínimo del 30 % de agua o más para que el efecto plastificante sea efectivo.

Lisina químicamente disponible o reactiva: Es la cantidad de lisina que puede reaccionar con fluorodinitrobenceno (FDNB) u otro reactivo como colorantes del tipo azo, por ejemplo, el naranja ácido 10' (Orange G), el naranja ácido 12' (AO-12) y el 1-fenilazo-2 naftol-6 ácido sulfónico. Recientemente, se ha denominado "*lisina enlazada a colorante*". Este método consiste en medir la capacidad de la proteína para unirse a un colorante antes y después de ser sometida a un tratamiento con anhídrido propiónico, el cual neutraliza el carácter básico de los grupos ϵ -NH₂ de las unidades de lisina, mediante un mecanismo de propionilación. La diferencia entre el contenido del colorante azo ligado a la proteína y la concentración de colorante unido a la proteína después de la propionilación, es un indicador de la cantidad de lisina disponible.

Maíz común o normal: Las variedades de los híbridos de maíz común o normal se definen como aquellas cuyas proteínas son deficientes en lisina y triptófano, aminoácidos esenciales en la alimentación humana.

Maíz de alta calidad proteínica (QPM): Son híbridos de maíz que contienen el doble del contenido de lisina y triptófano con respecto a las variedades de maíz normal. Comparado con su progenitor, el maíz Opaco-2, es resistente a plagas, probablemente debido a la sobreexpresión de los genes responsables de evitar la pudrición de la mazorca. Tienen mejor altura de la planta, mazorcas más grandes y un alto potencial de rendimiento que puede ser de 10 a 15 % mayor con respecto al maíz Opaco-2. Además, en los maíces QPM la relación de endospermo vítreo con respecto al harinoso también es mayor.

Masa: Pasta resultante de la molienda del nixtamal en un molino hecho con piedra volcánica de manufactura artesanal; esta se lleva a cabo con la adición de agua, de tal manera que la masa llega a tener de un 48 a un 55 % de humedad.

Nejayote: Líquido proveniente de la cocción y reposo en medio alcalino del grano de maíz; el cual es altamente contaminante.

Nixtamal: Grano de maíz derivado de la cocción alcalina, reposo y lavado, el cual llega a tener desde un 48 hasta un 55 % de humedad.

Nixtamalización: Vocablo proveniente del Náhuatl *nixtli* = cenizas y *tamalli* = masa. Es el cocimiento del grano de maíz en una solución de Ca(OH)₂ al 1 %

(w/v), en una proporción de 2:1 (Ca(OH)_2 al 1 % : grano de maíz) y posterior remojo (reposo) en el agua de cocción por un periodo de 6 a 18 horas.

Templado (annealing): Fenómeno que involucra la incubación de los gránulos de almidón en un exceso de agua (> 40 % w/w), durante cierto periodo de tiempo (horas o incluso días), a una temperatura por arriba de la temperatura de transición vítrea y por debajo de la temperatura de gelatinización del almidón (50-55 °C).

Utilización proteínica neta (NPU): Es la proporción el nitrógeno ingerido y que es retenido por un organismo. También, se define como el producto de multiplicar el valor biológico por la digestibilidad. Si la medición de la NPU se efectúa bajo condiciones estándar, con una ingestión de proteína de 10 % (100 g por kg de dieta) o menor, el valor se denomina NPU estandarizado. Por el contrario, si el alimento o dieta se suministra como tal, sin diluciones o adiciones, la NPU se denomina operativa (NPU_{op}). Esta medida es similar a la razón proteínica neta si se utiliza el peso corporal para calcular el N corporal. Si no se hace la corrección por pérdidas endógenas de nitrógeno, el valor se denomina NPU aparente (NPU_{ap}).

Valor biológico: Es la porción de nitrógeno absorbido que es retenida para mantenimiento y/o crecimiento.

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición química del grano de maíz y de sus estructuras anatómicas (g/100 g base seca).....	17
Tabla 2. Modificaciones en el grano de maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino y algunos aspectos ecológicos.....	31
Tabla 3. Fraccionamiento secuencial de las proteínas del maíz QPM H-368.....	55
Tabla 4. Análisis químico proximal del maíz QPM H-368 nativo (g/ 100 g de muestra).....	63
Tabla 5. Contenido de aminoácidos esenciales (mg/g de proteína) en las muestras experimentales.....	80
Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre las variables analizadas.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura anatómica del grano de maíz.....	10
Figura 2. Micrografía del endospermo del grano de maíz QPM H-368 nativo, en donde se muestra la presencia de cuerpos proteínicos (CP), la matriz proteínica (MP), gránulos de almidón en forma poliédrica (GP), gránulos de almidón en forma esférica (GE) y los cuerpos proteínicos (CP).....	12
Figura 3. Micrografía de la capa de aleurona en el grano de maíz QPM H-368 nativo, en donde se distingue el endospermo (E), la capa de aleurona (CA), la subaleurona (SA) y el pericarpio (P).....	14
Figura 4. Micrografía del germen en el grano de maíz QPM H-368 nativo, en donde se aprecia la presencia de los cuerpos grasos (CG)..	15
Figura 5. Proceso tradicional de nixtamalización.....	20
Figura 6. Patrones de difracción de rayos X característicos de la amilosa, amilopectina y almidón de maíz (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007)....	25
Figura 7. Patrones de difracción de rayos X característicos del endospermo vítreo y harinoso del maíz QPM H-368 nativo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007).....	26
Figura 8. Patrones de difracción de rayos X del primer raspado (10 % w/w del peso total del endospermo), del segundo raspado (10 % w/w consecutivo) y del 80 % remanente del grano de maíz nativo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007).....	27

Figura 9. Patrones de difracción de rayos X del a) primer raspado, b) segundo raspado y c) 80 % remanente del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007).....	29
Figura 10. Maíz QPM H-368 desarrollado por el CIMMYT y cultivado en el INIFAP Unidad Bajío.....	42
Figura 11. Equipo HPLC (Waters 2487) para la determinación del contenido de aminoácidos esenciales.....	46
Figura 12. Turbina de baja velocidad con punta de diamante.....	48
Figura 13. Esquema del sistema de cocción computarizado con control de temperatura (NCCP) (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	50
Figura 14. Diagrama de bloques para la elaboración de harinas de maíz nixtamalizado (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	52
Figura 15. a) Vista frontal del endospermo del maíz QPM H-368 nativo. b) Vista superior del grano (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007).....	64
Figura 16. Micrografías obtenidas mediante LV-SEM del maíz QPM H-368 nativo: a) y b) Endospermo vítreo, c) y d) Endospermo harinoso (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007)	66
Figura 17. Contenido de humedad en el grano de maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en Ca(OH) ₂ al 1 % (w/v) durante la etapa de cocción (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	67
Figura 18. Contenido de calcio en el pericarpio del grano de maíz	

QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en Ca(OH) ₂ al 1 % (w/v) durante la etapa de cocción.....	67
Figura 19. Perfiles térmicos del grano de maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en Ca(OH) ₂ al 1 % (w/v) y a diferentes tiempos de reposo (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	68
Figura 20. Contenido de proteína (% Nx6.25) en el maíz QPM H-368 nativo, muestra control y harinas de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2008).....	70
Figura 21. Contenido de proteína en las fracciones proteínicas extraídas a partir del grano nativo, muestra control y HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2008).....	72
Figura 22. Contenido de lisina total y lisina reactiva en el grano nativo, en la muestra control y en las HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2008).....	75
Figura 23. Contenido de triptófano en el grano nativo, en la muestra control y en las HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2008).....	77
Figura 24. Digestibilidad de la proteína <i>in vitro</i> en la caseína, en el grano nativo, en la muestra control y en las HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2008).....	81
Figura 25. Contenido de calcio en el grano total de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo, en la muestra control y en el en el grano nativo.....	83
Figura 26. Contenido de calcio en el endospermo total, en el pri-	

mer raspado (10 % w/w del endospermo total), en el segundo raspado (subsiguiente 10 %) en el 80 % remanente del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo, en la muestra control y en el grano nativo.....	85
Figura 27. Termogramas obtenidos mediante DSC convencional del endospermo del grano de maíz nixtamalizado correspondientes al a) primer raspado, b) segundo raspado y c) 80 % remanente (Rojas-Molina <i>et al.</i> , 2007).....	87
Figura 28. Micrografía del pericarpio del maíz QPM H-368 nativo en donde se observan las fibras unidireccionadas de celulosa, hemicelulosa y lignina (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	89
Figura 29. Micrografía del pericarpio del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH) ₂ a 0 h de reposo, en donde se aprecian las fibras unidireccionadas de celulosa, hemicelulosa y lignina adelgazadas (F) y cristales de CaCO ₃ (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	90
Figura 30. Micrografías del pericarpio y endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH) ₂ a) 3 h, b) 5 h, c) 7 h y d) 9 h de reposo (Gutiérrez <i>et al.</i> , 2007).....	91
Figura 31. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nativo, donde se observan los gránulos de almidón (GA) y la matriz proteínica (MP).....	92
Figura 32. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH) ₂ a 5 h de reposo, donde se observa la matriz proteínica (MP), los gránulos de almidón (GA) y los	

cuerpos proteínico (CP).....	93
Figura 33. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH) ₂ a 7 h de reposo, donde se muestran los gránulos de almidón (GA) y la matriz proteínica (MP).....	94
Figura 34. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH) ₂ a 9 h de reposo, donde se observan los gránulo de almidón (GA) y la matriz proteínica (MP).....	94
Figura 35. Contenido de proteína en las capas externas (20 % w/w del endospermo total), en las capas internas (80 % remanente) del endospermo del grano nixtamalizado en función del tiempo de reposo, muestra control y grano nativo.....	96
Figura 36. Contenido de lisina y triptófano en las capas externas (20 % w/w del endospermo total), en las capas internas (80 % remanente) del endospermo del grano nixtamalizado en función del tiempo de reposo, muestra control y grano nativo.....	97

RESUMEN

La presente tesis doctoral tiene como objetivo principal evaluar la concentración de calcio y la digestibilidad de la proteína en el grano de maíz QPM H-368 sometido a un tratamiento térmico alcalino en diferentes tiempos de reposo, así como el contenido de calcio, lisina y triptófano en diferentes capas del endospermo del maíz objeto de estudio nixtamalizado en función del tiempo de reposo, para correlacionar la calidad de la proteína con el grado de fijación del calcio en el grano. La relación entre el contenido de calcio y el contenido de lisina y triptófano se circunscribe al endospermo del grano, dado que esta estructura constituye el 79.4 % de su peso total y en ella se localiza el 81 % de la proteína de este cereal.

Inicialmente, se caracterizó la materia prima y se estandarizó el proceso de nixtamalización para preparar las muestras experimentales, utilizando un sistema de cocción computarizado con control de temperatura (NCCP). Se evaluaron las modificaciones en el contenido de proteína, lisina reactiva, lisina total, triptófano y la digestibilidad de la proteína en el grano de maíz nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo (desde 0 hasta 15 h). El contenido de proteína se determinó con el método de la AACC (2000), en tanto que el contenido de lisina total y triptófano por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El contenido de lisina reactiva se analizó con el método establecido por Hurrell *et al.* (1979). La digestibilidad de la proteína se determinó *in vitro* por el método de Hsu *et al.* (1977). Posteriormente, se analizó el contenido de calcio residual en el grano total y en las capas externas (10 % w/w y subsiguiente 10 % w/w del peso total del grano) e internas (80 % w/w remanente) del endospermo del grano nixtamalizado mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA). También se evaluó el grado de gelatinización del almidón y las modificaciones en la morfología del endospermo del grano nixtamalizado empleando las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía electrónica de barrido a bajo vacío (LV-SEM). Posteriormente, se analizó el contenido de lisina total y triptófano en las capas externas e internas del endospermo. Finalmente, se correlacionó el contenido de calcio en el grano total con la digestibilidad de su proteína y el contenido de lisina y triptófano en el endospermo del grano nixtamalizado con el calcio fijado en esta estructura.

Se estableció el contenido de calcio en el pericarpio (w/w) y la humedad del grano, como parámetros cuantitativos para definir el tiempo de cocción durante el proceso de nixtamalización. Se demostró que el contenido de lisina, triptófano y la digestibilidad del grano procesado se modifica en función del tiempo de reposo, no obstante, la relación entre estas variables no fue lineal. Se evidenció que el fenómeno de gelatinización del almidón tiene lugar principalmente en las capas externas de esta estructura, en donde el contenido de calcio es mayor. El contenido de lisina total y triptófano fue mayor en las capas externas del endospermo. Se detectó una correlación negativa entre el contenido de calcio en el grano y la digestibilidad de la proteína, así como entre el calcio fijado en el endospermo del grano nixtamalizado y el contenido de lisina de esta estructura. No se observó una correlación entre la concentración de calcio y triptófano en el endospermo del grano procesado.

Los resultados contribuyen a conciliar las discrepancias relacionadas con las modificaciones en la calidad de la proteína en el maíz nixtamalizado previamente reportadas (Bressani *et al.*, 1958; Trejo *et al.*, 1982; Ortega *et al.*, 1986), debido a que el proceso de nixtamalización fue estandarizado y a que la digestibilidad de la proteína y la cuantificación de lisina y triptófano se realizó a diferentes tiempos de reposo. El concepto actual del proceso de nixtamalización debe redefinirse como el tratamiento térmico alcalino del grano, en donde ocurre una gelatinización total de los gránulos de almidón de las capas externas del endospermo del grano y una gelatinización parcial del almidón de las capas internas. Las modificaciones en los componentes químicos y la calidad proteínica del grano nixtamalizado, deben abordarse en lo sucesivo, considerándolo como un sistema no homogéneo, es decir, en forma estratificada.

ABSTRACT

The main objective of the present doctoral thesis is to evaluate the calcium content and the protein digestibility of nixtamalized QPM H-368 endosperm at different steeping times, as well as, calcium, total lysine and tryptophan contents in different layers of nixtamalized corn endosperm as a function of the steeping time, in order to correlate the protein quality with the calcium attached to corn kernel. The relationship between the calcium content and lysine and tryptophan contents is mainly restricted to the endosperm corn kernel, due to this structure constitutes 79.4% of corn kernel total weight and contains 81% of total protein.

First, the raw corn was characterized and the nixtamalization process was standardized in order to prepare the experimental samples by using a computerized cooking system with temperature control (NCCP). Then, the changes in protein content, reactive lysine, total lysine, tryptophan and protein digestibility in nixtamalized corn kernel were evaluated at different steeping times (from 0 to 15 h). Protein content was analyzed employing the methods approved by AACC (2000), total lysine and tryptophan contents were quantified by high pressure liquid chromatography (HPLC). Reactive lysine content was studied by method established by Hurrell *et al.* (1979). Protein digestibility was evaluated *in vitro* by Hsu *et al.* (1977) method. Subsequently, the calcium content in total corn kernel and in the outermost 10% layers (w/w), the subsequent 10% (w/w) and the remaining 80% (w/w) of the nixtamalized corn endosperm were studied by using atomic absorption spectroscopy (EAA). Additionally, the thermal and morphological changes in the peripheral and inner layers of the nixtamalized corn were analyzed using differential scanning calorimetry (DSC) and low-vacuum scanning electron microscopy (LV-SEM) techniques. In addition, the total lysine and the tryptophan contents in nixtamalized corn endosperm layers were investigated. Finally, calcium content and protein digestibility in total nixtamalized corn kernel were correlated. Furthermore, lysine and tryptophan contents in corn endosperm were correlated with the calcium attached in the endosperm layers.

The corn kernel moisture and the calcium content in corn pericarp (w/w) were established as quantitative parameters to define the cooking time in the nixtamalization process. The results showed that in processed corn, the lysine and tryptophan contents and protein digestibility modify as a function of the steeping time, although, the relationship between these factors is not linear. In the same way, these results evidenced that the most important change in the gelatinization phenomena of corn starch, takes place mainly in the external layers of the endosperm, where the calcium content is higher compared with the most internal layers of this structure. Similarly, the total lysine and tryptophan contents were higher in peripheral endosperm in comparison to the inner endosperm. A negative correlation was detected between the calcium content and protein digestibility in total nixtamalized corn kernels. Also, a negative correlation was observed between the calcium attached in the nixtamalized corn endosperm and the lysine content in this structure. On the other hand, there was not a correlation between the calcium and the tryptophan contents in nixtamalized corn endosperm.

These results contribute to conciliate the disagreements related to the protein quality changes in nixtamalized corn previously reported (Bressani *et al.*, 1958; Trejo *et al.*, 1982; Ortega *et al.*, 1986), since the nixtamalization process was standardized and the protein digestibility, lysine and tryptophan contents were determined at different steeping times. The actual concept about the nixtamalization process must be redefined as the thermo alkaline treatment in corn kernel, where there is a total gelatinization of the starch granules from the most external layers, and a partial gelatinization of the innermost internal layers of the endosperm. The changes in chemical components and protein quality in nixtamalized corn must be directed henceforth, considering that the corn kernel is not a homogeneous system, in other words, in a stratified way.

1. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L) es el cereal de mayor importancia en términos de producción en el mundo, superando la del trigo (*Triticum aestivum* L) y del arroz (*Oryza sativa* L). Estos tres cereales conforman la base de la alimentación mundial, particularmente en África y América Latina, en donde la proteína de origen animal no es asequible para un gran sector de la población por su costo elevado y su baja disponibilidad (FAO, 2006).

En las variedades de maíz normal las proteínas son deficientes en lisina y triptófano, aminoácidos esenciales para la nutrición humana. Lo anterior constituye una de las razones, por las que se han introducido nuevas variedades de maíz conocidas como de alta calidad proteínica o Quality Protein Maize (QPM, por sus siglas en inglés), en donde el contenido de lisina y triptófano se ha incrementado hasta en un 30 y 50 % respectivamente, con relación a las variedades de maíz normal (Mertz *et al.*, 1964; Motto *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1998; Prasanna *et al.*, 2001). La proteína del maíz representa para ciertos sectores de la población mexicana, el 50 % de la ingesta proteínica de una persona adulta (FAO, 2006).

Lo anterior significa que el maíz está aportando únicamente el 33 y el 55 % del requerimiento diario de lisina y triptófano, respectivamente, para un adulto de acuerdo con las recomendaciones del Comité de Expertos de Energía y Proteína de la FAO/OMS/UNU (1985). Esto sin considerar que la lisina y el triptófano se pierden durante el procesamiento del grano como por ejemplo: la molienda, secado, procesos de extracción o la combinación de ellos (Prasanna *et al.*, 2001).

En México, el maíz se consume principalmente en forma de tortilla y productos nixtamalizados, entre más bajo es el nivel socioeconómico de la población mayor es la dependencia hacia las tortillas (Serna *et al.*, 1988b; Bressani, 1997; FAO, 2006). La población mexicana recibe a partir del maíz, aproximadamente, el 50 % de la ingesta calórica y proteínica de una persona adulta, en donde el contenido de almidón y proteína en este cereal es en promedio de 71.5 y 10.3 %, respectivamente (Paredes y Saharopulos, 1983; Serna, 1997; Paredes *et al.*, 2000; Sefa-Dedeh *et al.*, 2003).

La elaboración de la tortilla se realiza a través del cocimiento alcalino del maíz, el cual es un método ancestral para su preparación culinaria, practicado por las culturas asentadas principalmente en México y Guatemala, desde la época precolombina hasta el momento actual, sin haber experimentado modificaciones importantes (Bressani *et al.*, 1958; Sefa-Dedeh *et al.*, 2003). Este proceso es comúnmente conocido como **nixtamalización**, el cual se lleva a cabo en dos etapas: la primera consiste en el calentamiento del grano (precocido) y la segunda en el

reposo del mismo en su líquido de cocción. Ambas etapas se realizan en presencia de una solución saturada de hidróxido de calcio, cuya concentración puede variar de 0.5 a 2 %, aunque la mayoría de los estudios realizados sobre el proceso de nixtamalización reportan una concentración del 1 % (Bressani y Scrimshaw, 1958; Sproule *et al.*, 1988; Almeida *et al.*, 1998; Sahai *et al.*, 2000).

El tratamiento térmico alcalino del maíz tiene tres propósitos fundamentales que consisten en: 1) facilitar la disponibilidad de sus proteínas, 2) permitir la incorporación del calcio al grano, 3) promover la remoción parcial de su estructura más externa conocida como pericarpio y 4) producir la gelatinización parcial del almidón, lo que da lugar al acondicionamiento del grano para el desarrollo y la formación de una masa cohesiva y maleable, la cual se moldea y termina de cocer sobre una placa caliente. En este caso al producto así obtenido se le denomina tortilla (Trejo-González *et al.*, 1982; Martínez-Bustos *et al.*, 2001; Shandera y Jackson, 2002; Rojas-Molina *et al.*, 2007). A partir del maíz nixtamalizado se elaboran también diversos productos como son: tamales, atole, frituras, harinas instantáneas, entre otros (Trejo-González *et al.*, 1982; González *et al.*, 2004).

El empleo de harinas nixtamalizadas industrialmente se está incrementando principalmente entre la población urbana, debido a su utilidad como materia prima para la preparación de tortillas y de otros productos. Esto en virtud de que eliminan las labores intensivas y tediosas del proceso tradicional de fabricación (cocimiento, reposo, molienda). Se presume que el producto es homogéneo y prevalece un mejor control higiénico durante su elaboración, lo que permite prolongar su vida de anaquel. Sin embargo, sus principales desventajas radican en una menor calidad de los productos elaborados respecto al sabor y la textura, así como contenidos de calcio inferiores comparados con los productos tradicionales (Gómez *et al.*, 1996; Bressani y Billeb, 2001; Bressani *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2004, Gutiérrez *et al.*, 2007).

Desde hace algunas décadas, los productos nixtamalizados han incrementado su popularidad en todo el mundo, llegando a comercializarse mediante la producción de harinas instantáneas para la elaboración de productos tipo botana (Yau *et al.*, 1999). De acuerdo con la Asociación de la Industria de la Tortilla (TIA), las ventas mundiales fueron estimadas en 7,000 millones de dólares estadounidenses en el 2002. Únicamente en los Estados Unidos de Norteamérica las ventas ascendieron a más de 4,000 millones de dólares, lo que representó una tasa de crecimiento de más del 57 % en los últimos cuatro años (Tortilla Industry Association, 2003).

Actualmente, la tortilla reaparece como uno de los temas de mayor interés a nivel nacional, ya que México se ha visto en la necesidad de importar maíz para satisfacer las demandas de este cereal considerado como de primera necesidad (FAO, 2006; Barros, 2007; Vanegas, 2007).

Uno de los fenómenos mayormente estudiados que se presentan en el grano de maíz nixtamalizado es la **gelatinización** del almidón. Lo anterior debido a su importancia para el desarrollo de las propiedades texturales y reológicas de la **masa** empleada para la producción de tortillas.

El almidón es el componente químico mayoritario del grano de maíz, el cual se localiza en paquetes o gránulos recubiertos por una matriz proteínica (Watson, 2003). El almidón está conformado por dos estructuras macromoleculares: la amilosa y la amilopectina, las cuales mantienen una organización estructural y un arreglo relativo en el interior de los gránulos de almidón (Gérard *et al.*, 2000). Este orden se manifiesta en el carácter cristalino de estos glucanos, el cual se modifica durante el proceso de nixtamalización. Con respecto a este punto, Rojas-Molina *et al.* (2007) estudiaron la estructura cristalina del almidón en el endospermo del maíz nixtamalizado mediante difracción de rayos X, observando que la **cristalinidad** del almidón en las capas periféricas de esta estructura se destruye, en tanto que la **estructura cristalina** del almidón de las capas internas se conserva, sin que se favorezca la recristalización y el fenómeno de **templado (annealing)** del almidón. Estos investigadores llevaron a cabo por primera vez, el estudio de los cambios en la cristalinidad del almidón del grano de maíz considerándolo como un sistema multicapa. Los cambios estructurales del almidón también están asociados al fenómeno de **gelatinización**, el cual ocurre cuando la estructura molecular de los gránulos de almidón se destruye, a través de su calentamiento en presencia de agua (Atwell *et al.*, 1988). Todos estos trabajos se realizaron sin considerar el origen anatómico-estructural de las partículas que constituyen el nixtamal y la masa, así como la relación entre el contenido de calcio y las transformaciones estructurales y morfológicas del grano procesado.

Con relación a las modificaciones en el contenido de aminoácidos del maíz sometido al tratamiento térmico alcalino, Bressani y Scrimshaw (1958) reportaron pérdidas de arginina (18.7 %), histidina (11.7 %), lisina (5.3 %), leucina (21 %) y cistina (12.5 %). No obstante, detectaron a través de estudios enzimáticos *in vitro*, que la liberación del nitrógeno α -amino fue más rápida en la tortilla que en el maíz crudo. Trejo-González *et al.* (1982), señalaron que el proceso de nixtamalización, aumenta el contenido de lisina disponible en el maíz hasta en un 39 %. Ortega *et al.* (1986), reportaron pérdidas mínimas de triptófano y lisina en el maíz normal y en el maíz QPM transformado en tortilla con respecto al maíz crudo. Sin embargo, a diferencia de lo

anteriormente señalado, estos autores describen un ligero incremento en el contenido de lisina (6 %) en el nixtamal del maíz normal comparado con el grano no procesado y una reducción del 25 % en el contenido de lisina disponible. Bressani *et al.* (1990) observaron pérdidas de lisina en nixtamal (1-4 %) y tortillas (8.2 %) de maíz normal. Por el contrario, reportan un incremento de este aminoácido en el nixtamal del maíz QPM *Nutricia* (3.1 %) y en las tortillas de maíz normal (5.4 %). La pérdida de triptófano fue del 28 % en el maíz normal y del 26 % en el maíz QPM *Nutricia* transformados en tortillas, mediante procedimientos de elaboración tradicional. No obstante, no pudieron dar explicación al incremento de lisina observado y a la pérdida tan significativa de triptófano

Con respecto a las modificaciones en el contenido de proteína extraída en las fracciones proteínicas por el método de Landry y Moureaux (1970), se ha reportado que la solubilidad de las fracciones proteínicas solubles en agua (albúminas), en NaCl (globulinas) y en etanol (zeínas), disminuye significativamente en el maíz nixtamalizado (Bressani y Scrimshaw, 1958). Posteriormente, Trejo-González *et al.* (1982) observaron que el proceso de nixtamalización, reduce el porcentaje de la proteína presente en las fracciones de albúminas, globulinas, zeínas y glutelinas, en tanto que el contenido de proteína en el residuo (remanente del proceso de extracción proteínica) se incrementa. Vivas *et al.* (1987) demostraron la pérdida de proteínas solubles en solución salina en el grano de maíz normal después de ser sometido al proceso de nixtamalización, especialmente en aquellas con bajo peso molecular (debajo de 12 kDa), detectando una reducción en la intensidad de las bandas correspondientes a la fracción de prolaminas. Este mismo grupo, reportó la presencia de proteínas de mayor peso molecular en los patrones electroforéticos pertenecientes a las glutelinas en el nixtamal y la masa de maíz.

Los estudios relacionados con la calidad proteínica del maíz nixtamalizado demuestran que la eficiencia proteínica relativa (ganancia en peso corporal con respecto a la proteína ingerida) en ratas alimentadas con tortilla fue mayor con respecto al maíz crudo Bressani *et al.* (1990).

La información concerniente a la posible asociación entre la calidad proteínica del maíz nixtamalizado con el calcio, señala que la cantidad de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ empleada durante el proceso está directamente relacionada con la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado, y por lo tanto, con la cantidad de calcio que se incorpora al grano (Bressani, 1990).

Los resultados contradictorios de los trabajos anteriormente señalados, podrían atribuirse, en parte, a distintos métodos analíticos aplicados, a diferentes variables y a la heterogeneidad en los niveles de las variables empleadas durante el proceso (variedad de maíz, concentración

de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, tiempo de reposo, temperatura, etc.), lo que dificulta la realización de un análisis comparativo entre ellos y por esta razón, tampoco son concluyentes.

Con base en estos antecedentes, resulta evidente que en la actualidad únicamente se tiene un conocimiento limitado acerca de las modificaciones en la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado y de su relación con el calcio. Así mismo, tampoco se han reportado estudios sistemáticos, relacionados con las transformaciones morfológicas y en las transiciones de fase de la gelatinización del almidón en el grano de maíz nixtamalizado durante la etapa de reposo, considerándolo como un sistema no homogéneo, así como del papel que desempeña el calcio en estas modificaciones.

Desde esta perspectiva surgió la presente disertación, como parte de un proyecto de investigación interdisciplinario, que tiene por objeto determinar la relación entre la calidad de la proteína y el calcio fijado en el grano de una variedad de maíz QPM nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo. El estudio de la relación entre el contenido de Ca^{2+} y la digestibilidad de la proteína se evaluó en el grano total, en tanto que la relación entre la concentración de lisina y triptófano y el Ca^{2+} se circunscribe al endospermo del grano, dado que esta estructura constituye la fracción mayoritaria del peso total del grano (79.4 %) y en ella se localiza el 81 % de la proteína de este cereal.

A este respecto, se consideró que pudiera existir una correlación entre el calcio fijado en el maíz nixtamalizado y su calidad proteínica, porque se ha demostrado que la calidad de la proteína de los productos nixtamalizados es mayor con respecto a la del maíz sin procesar, así como a la del maíz sometido a un tratamiento térmico en ausencia de álcali. Lo anterior, se atribuye a una liberación más rápida de los aminoácidos esenciales en el organismo, lo que indica que el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ desempeña un papel fundamental para mejorar la biodisponibilidad de las proteínas del maíz. Así mismo, se ha reportado que la formación de péptidos como la lisinoalanina (LAL) es mayor en los productos nixtamalizados con NaOH y KOH , en comparación con los productos procesados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Con relación a este punto, se ha sugerido que los iones de Ca^{2+} pueden interferir en el mecanismo de formación de la LAL (Chu *et al.*, 1976).

Finalmente, en esta investigación se considera que es muy importante tener una comprensión profunda de los fenómenos físicos y químicos que tienen lugar en el grano durante el método tradicional de nixtamalización. Lo anterior, con la finalidad de establecer las bases científicas, para que en un futuro se puedan proponer innovaciones tecnológicas en este proceso. Adicionalmente, los productos de maíz nixtamalizado con la técnica tradicional, continúan considerándose como un estándar de calidad. Esto en virtud de que presentan

características reológicas y organolépticas, cuyos parámetros son los ideales para los productos derivados de este método empleado para el procesamiento industrial del maíz (González *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2004).

Capítulo 1

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 DESCRIPCIÓN DEL MAÍZ

2.1.1 Origen del maíz

La palabra maíz es de origen caribeño y significa literalmente “lo que sustenta la vida”. El maíz es uno de los cereales más importantes del mundo, suministra elementos nutritivos a los seres humanos, a los animales y es una materia prima básica de la industria de la transformación, con la que se producen almidón, aceite, proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes alimenticios y, desde hace poco, combustible (FAO, 1993; Biswas *et al.*, 2005).

El cultivo del maíz tuvo sus inicios con toda probabilidad en Mesoamérica, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte, hasta el Canadá y hacia el sur, hasta la Argentina. Al parecer todos los tipos principales de maíz conocidos hoy en día, clasificados como *Zea mays*, eran cultivados ya por las poblaciones autóctonas cuando se descubrió el Continente Americano. La evidencia más antigua de la existencia del maíz corresponde a unos 7,000 años de antigüedad, la cual fue encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México), sin embargo, es posible que hubiese otras regiones en donde se cultivara el maíz en América (Katz *et al.*, 1974; Farnham *et al.*, 2003).

La mayoría de los investigadores opinan que el maíz se desarrolló a partir del Teosintle, *Euchlaena mexicana* Schrod, cultivo anual que posiblemente sea el más cercano al maíz. Otros en cambio, suponen que se originó a partir de un maíz silvestre hoy en día desaparecido. La teoría de la proximidad entre el Teosintle y el maíz se basa en que ambos tienen 10 cromosomas y son homólogos o parcialmente homólogos (FAO, 1993).

Actualmente, se han desarrollado un gran número de especies de maíz ya sea a través de la selección empírica, el mejoramiento genético planeado, aunado al hecho de que este cereal es un cultivo de polinización abierta, dando origen a nuevas razas (Farnham *et al.*, 2003). Lo anterior, explica la diversidad de variedades que se conocen actualmente, entre las que se encuentran los maíces con alta calidad proteínica o QPM, cuyas características se explicarán más adelante con mayor detalle.

2.1.2 Estructuras anatómicas del grano de maíz

El grano de maíz, está constituido por cuatro estructuras anatómicas mayoritarias denominadas: pericarpio, endospermo, germen y cofia. En la Figura 1 se presentan las estructuras anatómicas fundamentales del grano, cada una de ellas se describen en detalle, señalándose su distribución ponderal en el grano y su composición química.

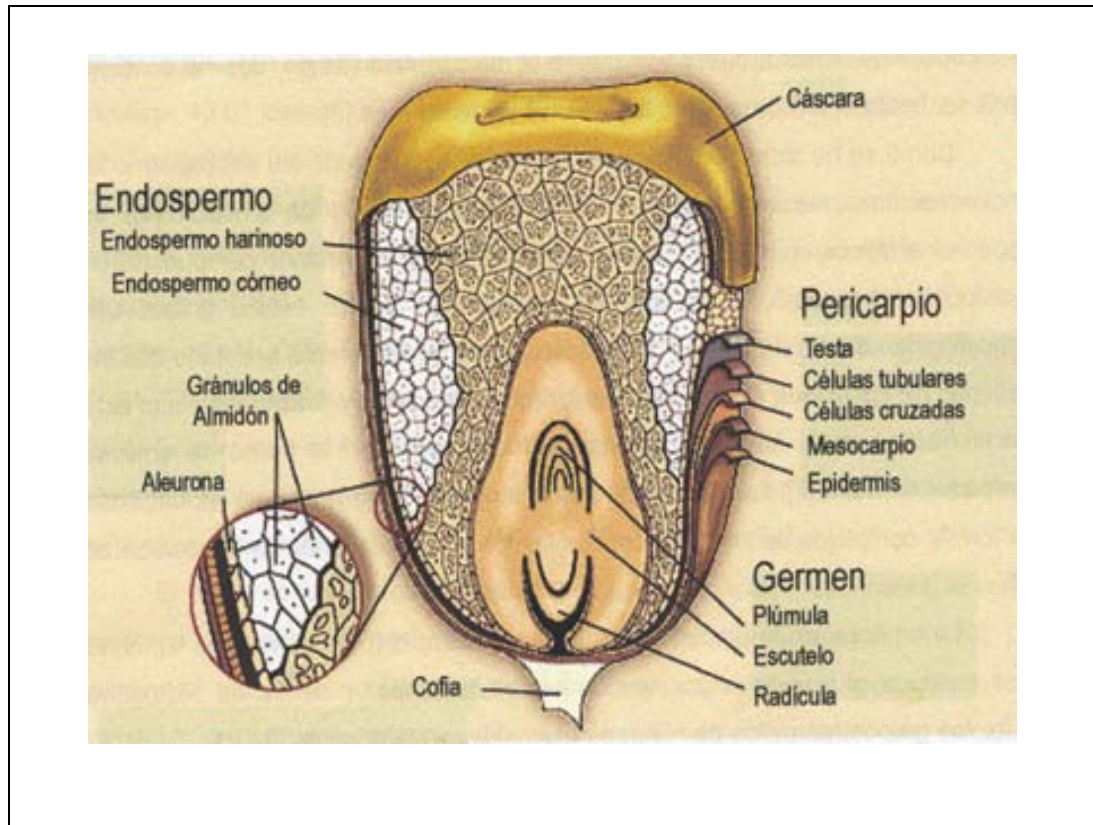


Figura 1. Estructura anatómica del grano de maíz. Adaptado de Hosney (1992) con modificaciones

2.1.2.1 Pericarpio

El pericarpio, comúnmente llamado “cáscara”, es la parte más externa del grano y representa entre el 5 y 6 % de su peso total. Esta estructura recubre por completo al endospermo y al germen, también se le conoce como cubierta seminal. Las capas que conforman el pericarpio desde la parte más externa del grano hacia el interior son: 1) epidermis, 2) mesocarpio, 3) células cruzadas, 4) células tubulares y 5) testa como se muestran en la Figura 1. Desde el punto de vista morfológico, el pericarpio está constituido por un conjunto de fibras de celulosa (23 %) inmersas dentro de una matriz formada por hemicelulosa (67 %). Ambas estructuras están compuestas de cadenas

construidas a partir de monómeros de glucosa unidas mediante puentes glucosídicos, en ellas se incluyen los ácidos poliurónicos, que son polisacáridos con grupos ácidos en el carbono 6 de la unidad monosacárida. Otro componente importante del pericarpio es la lignina, aunque no es un polisacárido, aparece generalmente asociada a las fibras celulósicas cuyas unidades estructurales son derivadas del 3,4 dihidroxifenil-propano.

El pericarpio es una estructura muy delgada su espesor varía de 62 a 160 micras de acuerdo a una evaluación efectuada en 33 variedades endogámicas (Helm y Zuber, 1969). El grosor del pericarpio varía de acuerdo a su localización en el grano, que resulta de los diferentes grados de compresión, en lugar del número de capas que lo conforman (Wolf *et al.*, 1952). En el caso del maíz QPM H-368, el espesor del pericarpio tiene un valor de $87 \pm 0.30 \mu\text{m}$ (Gutiérrez, 2006). Todas las subestructuras del pericarpio, a excepción de la capa mas interna denominada testa, están constituidas por células conformadas por tubos celulósicos huecos, los cuales forman canales que permiten la absorción de agua y facilitan su entrada a través de la cofia (Watson, 2003).

El término salvado es algunas veces utilizado como sinónimo de pericarpio. Su empleo debe limitarse al pericarpio que contiene productos de la molienda en seco del grano, estos incluyen a la cofia, a la capa de aleurona y piezas adheridas de endospermo duro o vítreo, en tanto que el producto proveniente de la molienda húmeda del grano se le denomina fibra (Watson, 2003).

El pericarpio es la principal fuente de fibra en el grano y se recomienda que durante el tratamiento térmico-alcalino se elimine parcialmente, ya que esta estructura es responsable del color indeseable de los productos procesados. La eliminación total del pericarpio durante la nixtamalización, ocasiona que los productos intermedios como la masa y harinas de maíz requieran de aditivos para mejorar sus propiedades mecánicas y térmicas, las cuales repercuten en la textura y flexibilidad de las tortillas (González *et al.*, 2004).

Por otra parte, el pericarpio desempeña un papel fundamental durante el proceso de nixtamalización. Lo anterior, debido a que representa una barrera para que la difusión de agua y de calcio tenga lugar hacia las estructuras más internas del grano. Adicionalmente, en el pericarpio se fija la mayor cantidad de calcio en el grano nixtamalizado, el cual es eliminado durante las etapas de lavado (Fernández *et al.*, 2002; 2004; Gutiérrez *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Endospermo

El endospermo representa aproximadamente del 82 al 84 % del peso total del grano de maíz en base seca. Está constituido de un 86-89 % de almidón, 9 % de proteínas, 1 % de lípidos, 0.5 % de azúcares simples, 0.3 % de trazas de minerales y 2 % de fibra cruda (hemicelulosas). El endospermo está conformado en su mayoría por células alargadas en cuyo interior se encuentran los paquetes de gránulos de almidón en forma esférica (GE) o poliédrica (GP) con un diámetro entre 5 a 30 μm (Schoch y Maywald, 1956), como se muestra en la Figura 2.

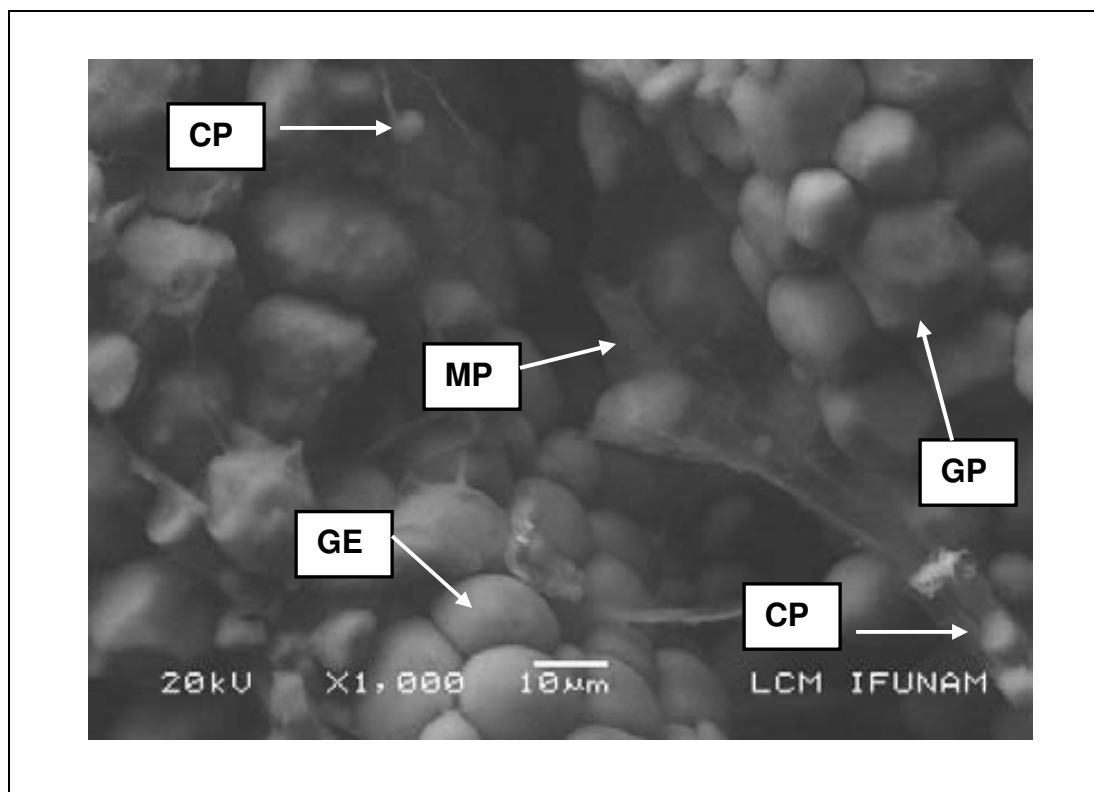


Figura 2. Micrografía del endospermo del grano de maíz QPM H-368 nativo, en donde se muestra la presencia de cuerpos proteínicos (CP), la matriz proteínica (MP), gránulos de almidón en forma poliédrica (GP), gránulos de almidón en forma esférica (GE) y los cuerpos proteínicos (CP).

En el grano maduro, cada gránulo de almidón se encuentra embebido en una matriz proteínica (MP) continua, en la cual se encuentran insertados estructuras granulares denominados cuerpos proteínicos (CP). En el grano de maíz se distinguen dos tipos de endospermo: el suave o harinoso y el duro, córneo o vítreo, cuya relación está asociada con la dureza del grano. Ambos tipos de endospermo están comprimidos

por la matriz proteínica que encapsula los gránulos de almidón. El endospermo harinoso se localiza en la fisura central del grano, en donde los gránulos de almidón recién formados se depositan, los cuales al aumentar de tamaño dan lugar a que la matriz proteínica se estire y se torne más delgada. Posteriormente, debido a la desecación del grano, las capas de la matriz proteínica no se alargan completamente y los gránulos adquieren una forma esférica. No obstante, la matriz proteínica sufre un desgarramiento dejando espacios de aire alrededor de los gránulos de almidón, los cuales impiden la transmisión de la luz, mostrando la opacidad característica del endospermo suave. El endospermo vítreo se encuentra principalmente en las partes laterales del grano. La matriz proteínica que lo recubre es más gruesa y resistente, la cual comprime los gránulos de almidón, mismos que adquieren una forma poliédrica; no presentan cavidades aéreas y son de aspecto traslúcido (Watson, 2003). El endospermo vítreo presenta un mayor contenido de proteína (entre 1.5 a 2.9 %) con respecto al endospermo harinoso; además, las propiedades vítreas del endospermo pueden estar correlacionadas con el contenido y composición de la proteína (Paiva *et al.*, 1991; Shandera y Jackson, 2002).

2.1.2.3 Capa de Aleurona

La capa de aleurona (CA) es la estructura más externa del endospermo (E) y lo separa del pericarpio (P), está constituida por una capa individual de células cuya apariencia puede diferir entre ellas tal como se muestra en la Figura 3.

La subaleurona (SA) cubre al endospermo y al germen, la cual se interrumpe únicamente en la capa hiliar en la cofia del grano y es más delgada en la parte que cubre al germen. Hinton (1953) determinó que el contenido de la capa de aleurona en las variedades de maíz cristalino o *flint* constituye el 2.2 % del peso del grano en base seca y contiene 19.2 % de proteína, en tanto que Duvick (1961) reportó un contenido de proteína del 42 %. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferentes técnicas de disección y a las variedades de maíz empleadas. Las células de la capa de aleurona tienen un contenido de apariencia granular, en donde se encuentran presentes cuerpos proteínicos, los cuales difieren en apariencia y son ligeramente más grandes comparados con los que se encuentran en el endospermo. Los cuerpos proteínicos de la capa de aleurona están organizados en un sistema vacuolar, a diferencia de los cuerpos proteínicos del endospermo que se originan en el retículo endoplásmico rugoso. Adicionalmente, la capa de aleurona contiene cuerpos grasos, sin embargo carece de almidón (Kyle and Styles, 1977). La aleurona contiene también minerales en forma de fitatos. La proteína presente

en la capa de aleurona presenta un perfil de aminoácidos favorable desde el punto de vista nutricional. Esta proteína es accesible únicamente a las enzimas de los animales monogástricos, cuando las células se rompen mediante procesos como la molienda (Saunders *et al.*, 1969).

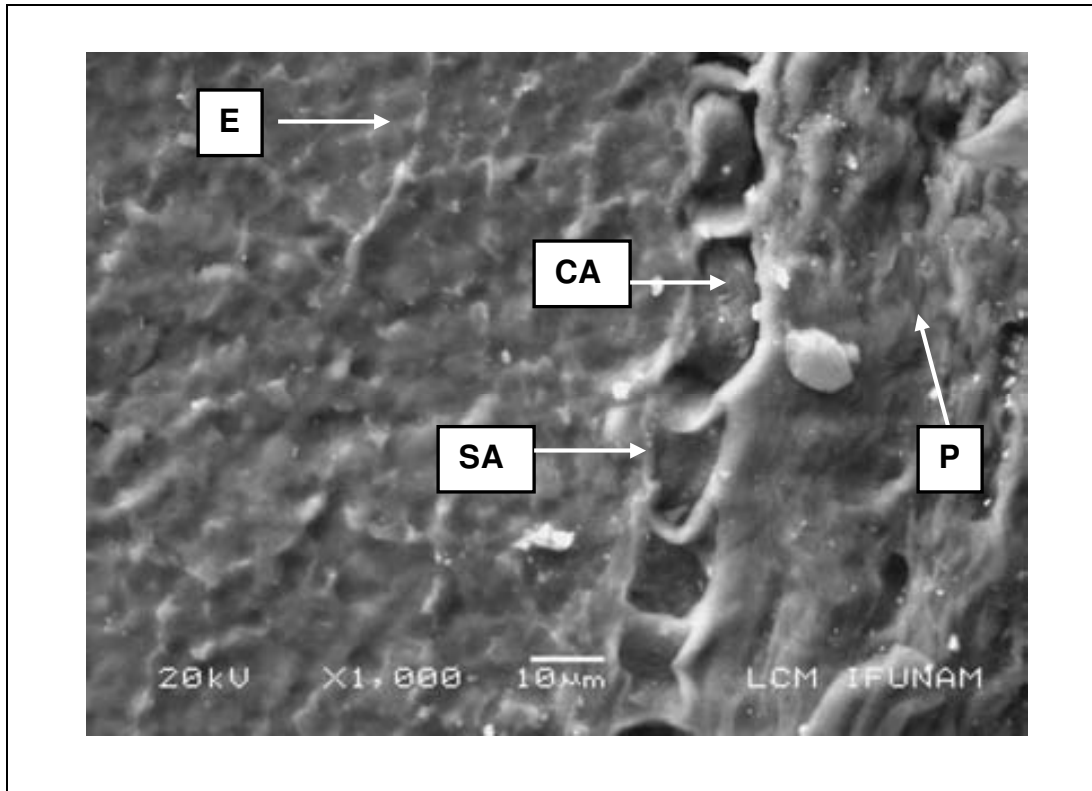


Figura 3. Micrografía de la capa de aleurona en el grano de maíz QPM H-368 nativo, en donde se distingue el endospermo (E), la capa de aleurona (CA), la subaleurona (SA) y el pericarpio (P).

2.1.2.4 Germen

El germen, formado por el embrión y el escutelo (Figura 1), constituye aproximadamente entre el 10 y 12 % del peso total del grano en base seca. El germen almacena nutrimentos y hormonas, los cuales son movilizados a todo el grano por las enzimas sintetizadas durante las etapas iniciales de la germinación (Logan *et al.*, 2001). El germen se caracteriza por su alto contenido de lípidos (34 %), también presenta niveles de proteína relativamente elevados (20 %), azúcares (12 %), almidones (8 %), elementos minerales (10 %), fibra cruda y hemicelulosa (14 %), trazas de almidón y otros compuestos (2 %). Aproximadamente el 60 % de las proteínas contenidas en esta estructura son globulinas y albúminas. La radícula que da origen al nuevo embrión, contiene todas las

enzimas esenciales, nutrientes y material genético para producir una nueva planta de maíz. En el escutelo están presentes los lípidos como componentes mayoritarios del germen en forma de gotas microscópicas denominadas esferomas o cuerpos grasos (CG), compuestos por una membrana de proteínas y lípidos, los cuales tienen un diámetro de 1-1.3 μm (Figura 4). Para que tenga lugar la interacción de los lípidos del germen (ácidos grasos: linoleico, oleico, palmítico, esteárico, linolénico, mirístico) con el medio alcalino (CaOH_2), este último debe ser capaz de degradar, al menos parcialmente, la membrana que cubre a los cuerpos grasos.

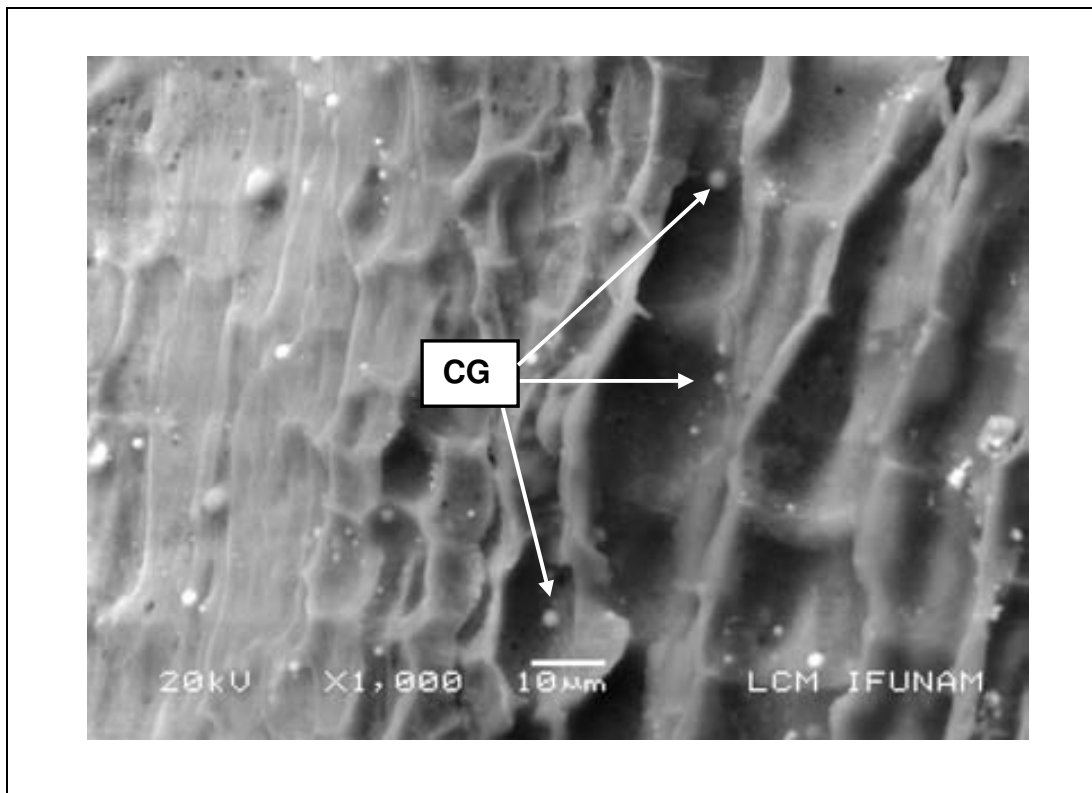


Figura 4. Micrografía del germen en el grano de maíz QPM H-368 nativo, en donde se aprecia la presencia de los cuerpos grasos (CG).

Los lípidos saponificables son mayoritarios en el germen y representan el 93 %, en donde los triglicéridos constituyen la fracción mayoritaria, con una abundancia del 85 %. La composición de las grasas del grano de maíz, en términos de ácidos grasos libres resulta aproximadamente en porcentaje en peso como sigue: mirístico 1-2 %, palmítico 7-11 %, esteárico 3-4 %, oleico 25-35 %, linoleico 50-60 %, existiendo también otros que son mayores de 18 carbonos (1-2 %) (Klaus y Karel, 1991; Watson *et al.*, 1987).

2.1.2.5 Cofia

Constituye la fracción minoritaria del grano, representa menos del 1 % del peso del grano de maíz. Es una estructura fibrosa que mantiene al grano unido con el olote y por la cual se transportan los nutrientes que el grano necesita durante la etapa de crecimiento. La cofia está constituida principalmente por celulosa; entre la base del germen y la punta se encuentra un tejido negro conocido como capa hilar que funciona como sello del grano, cuando éste ha alcanzado cierta madurez. Dentro de la cofia hay células esponjosas en forma de estrella, conectadas únicamente por los extremos de las ramas, formando así una estructura abierta que es continua con la capa de células cruzadas del pericarpio. Inmediatamente después de la punta, se expone una capa circular café oscura conocida como capa negra que se encuentra en contacto con la base del germen y del endospermo. Esta capa separa y probablemente tiene la función de sellar la punta al grano, siendo empleada como barrera que protege al grano contra la invasión de insectos y microorganismos. La cofia se encuentra conectada con la capa de células tubulares del pericarpio, lo que permite la distribución de nutrientes, la difusión de agua y de calcio hacia el endospermo (Klaus y Karel, 1991; Serna, 1996).

2.1.3 Producción e importancia del maíz en la dieta latinoamericana

La producción mundial de maíz en el 2005 fue de 692,034 millones de toneladas; aproximadamente el 40 % de la producción mundial se cosecha en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA), donde el grano es utilizado principalmente en la alimentación animal y para satisfacer las demandas de productos nixtamalizados de mercados externos. El segundo país productor de América es Brasil, en donde la mayoría del maíz también es canalizado a la industria productora de alimentos balanceados. México, con una población estimada en 103 millones de habitantes en el 2003, es el tercer país productor de maíz. A diferencia de EUA y Brasil, la mayoría de este cereal se destina al consumo humano directo. Este grano es principalmente procesado en productos nixtamalizados, en donde destaca la tortilla de mesa. Al igual que México, la mayoría de los países Centroamericanos como Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua también dependen de manera importante del maíz para la alimentación directa de su población (FAO, 2006).

Tradicionalmente, los EUA exportan grandes cantidades de este cereal. En el 2004, aproximadamente el 18 % del maíz se exportó, generando divisas por más de 5,000 millones de dólares. México y los países Centroamericanos se ven en la necesidad

de importar maíz para satisfacer las demandas de este cereal considerado como de subsistencia. En este mismo año, México importó más de 5.5 millones de toneladas de maíz, principalmente del mercado estadounidense, que sumadas a la producción doméstica de 20 millones de toneladas da un total de aproximadamente 25 millones de toneladas. Esta producción e importación representa 245 kg de maíz/*per capita*/año, sin considerar pérdidas por almacenamiento (aproximadamente 30 % en México), maíz canalizado a consumo animal y pérdidas que se tienen durante la industrialización. Por ejemplo, durante el proceso de nixtamalización hay pérdidas por procesos de limpieza (3-5 %) y por industrialización (7-15 %).

El consumo *per capita* de maíz en México es aproximadamente 10 veces mayor que el de los EUA. Un mexicano en promedio recibe aproximadamente 1,057 kcal y 27 g de proteína del maíz, lo que representa aproximadamente el 50 % de la ingesta calórica (2,000 kcal) y proteínica (56 g de proteína) diaria de una persona adulta (Serna, 1997; Paredes *et al.*, 2000; Sefa-Dedeh *et al.*, 2003; Tortilla Industry Association, 2003).

2.1.4 Composición química y valor nutrimental del maíz

En el Tabla 1 se muestra la composición química del grano de maíz común.

Tabla 1. Composición química del grano de maíz y de sus estructuras anatómicas (g/100 g base seca)

Estructura del grano	Peso (%)	Almidón	Proteína	Grasa	Azúcares	Cenizas	* FCH
Grano entero	100	72	10.3	4.8	2	1.7	9
Endospermo	83	87	9	1	0.5	0.2	2
Germen	12	8	20	34	12	10	14
Pericarpio	5	7	4	1	0.5	0.3	84

Fuente: Klaus y Karel (1991). Valores promedio aprox. * FCH = Fibra cruda + hemicelulosas

Los valores mostrados en la tabla anterior corresponden a la composición química de híbridos de **maíz normal** o **común**, así como de sus distintas estructuras anatómicas. Estos datos aportan información para evaluar las repercusiones del genotipo, de los factores ambientales y las prácticas agronómicas en el valor nutrimental del grano.

2.2.1.5 Proteínas del grano de maíz

Las proteínas del maíz se localizan principalmente en el endospermo y en el germen. Las proteínas presentes en el endospermo representan entre el 75 y el 82 % de la proteína total del grano (Paredes y Saharopulos, 1983).

El contenido proteínico está influenciado por la disponibilidad de nitrógeno del suelo donde fue cultivado y por la genética del grano. Los cambios en el contenido total de la proteína se atribuyen a las modificaciones de este componente en la parte interna a nivel del endospermo, principalmente de zeína (Johnson, 1991; Watson *et al.*, 1987a). Adicionalmente, las características del grano de maíz para su transformación y procesamiento están determinadas de manera primaria por las características morfológicas del endospermo (White y Johnson, 2003).

Las proteínas del maíz fueron clasificadas por Osborne y Mendel (1914) de acuerdo a su solubilidad en: albúminas (solubles en agua), globulinas (solubles en soluciones de sales), prolaminas solubles en soluciones de etanol y glutelinas (solubles en hidróxido de sodio).

En el endospermo se encuentran las prolaminas o zeínas en forma de agregados moleculares (cuerpos proteínicos), embebidos en una matriz proteínica integrada por glutelinas, las cuales se han clasificado como G₁, G₂ y G₃, dependiendo de los solventes empleados para su extracción. Las glutelinas G₁ y G₂ son solubles en una solución alcalina + mercaptoetanol (ME), las glutelinas G₃ son solubles en los mismos solventes + dodecilsulfato de sodio (SDS) (Landry *et al.*, 2000). Las zeínas y las glutelinas constituyen el 79 % del total de las proteínas del grano completo. Las albúminas y las globulinas predominan en el germen del grano y una porción mínima (6-8 %) se encuentra en el endospermo. Todas las fracciones proteínicas a excepción de las zeínas son abundantes en lisina y triptófano (Yau *et al.*, 1999).

2.1.6 Características de las variedades de maíz de alta calidad proteínica

Las proteínas de las variedades de los híbridos de maíz común o normal, a diferencia de las proteínas de las variedades de maíz de alta calidad proteínica son deficientes en lisina y triptófano, aminoácidos esenciales en la alimentación humana (Kies *et al.*, 1965; Bressani, 1975).

En 1964, el Dr. Edwin Mertz y colaboradores de la Universidad de Purdue (Indiana) reportaron una mutación espontánea en el cromosoma 7 en una variedad de maíz

denominada *Opaco-2* (*o2*). Se le denominó así por tener el endospermo suave y no permitir la transmisión de la luz, fenómeno que se ha utilizado para su denominación y se ha empleado como método de selección en los programas de mejoramiento (Mertz *et al.*, 1964). Se observó que este grano duplicaba el contenido de lisina y triptófano con respecto a los maíces comunes o normales. Sin embargo, debido a sus características ya que son muy suaves, de textura harinosa, peso de grano y rendimiento en campo muy bajo, son fácilmente atacados por las plagas, además de que son susceptibles al desarrollo y producción de aflatoxinas; no tuvieron gran aceptación para su producción agrícola (Yau *et al.*, 1999).

A partir de entonces, se realizaron por más de 30 años investigaciones en el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT), en donde se continuó trabajando para mejorar la calidad proteica del maíz *Opaco-2*, dentro de un proyecto fundado por el Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas. A través de varios ciclos de selección recurrente, en donde se emplearon injertos de maíz del CIMMYT y se combinaron con los genes provenientes de maíces normales y del maíz *Opaco-2*, los cuales codifican para un alto contenido de lisina, se dieron origen a las variedades de maíz con alta calidad proteínica conocidas como QPM. Lo anterior con la finalidad de modificar la suavidad original del endospermo del maíz *Opaco-2* (Vasal, 2001).

Los híbridos de maíz QPM contienen el doble del contenido de lisina y triptófano, con respecto a las variedades de maíz normal. Comparado con su progenitor el maíz *Opaco-2*, son resistentes a plagas en donde los genes causantes de la pudrición de la mazorca fueron eliminados. Tienen mejor altura de la planta, mazorcas más grandes y un alto potencial de rendimiento que puede ser de 10 a 15 % mayor con respecto al maíz *Opaco-2*. Además, en los maíces QPM la relación de endospermo vítreo con respecto al harinoso también es mayor (Glover, 1992 ; Prasanna *et al.*, 2001).

2.2 PROCESO DE NIXTAMALIZACIÓN

2.2.1 Descripción de método tradicional de nixtamalización

El proceso de transformación del maíz como se practica en las áreas de los países en donde se consume la tortilla, se lleva a cabo de acuerdo con el diagrama de flujo mostrado en la Figura 5, el cual ha sido descrito y revisado por varios investigadores

(Illescas, 1943; Wu-Leung y Flores, 1961; Serna *et al.*, 1990; Bressani, 1990; De Chávez *et al.*, 1992).

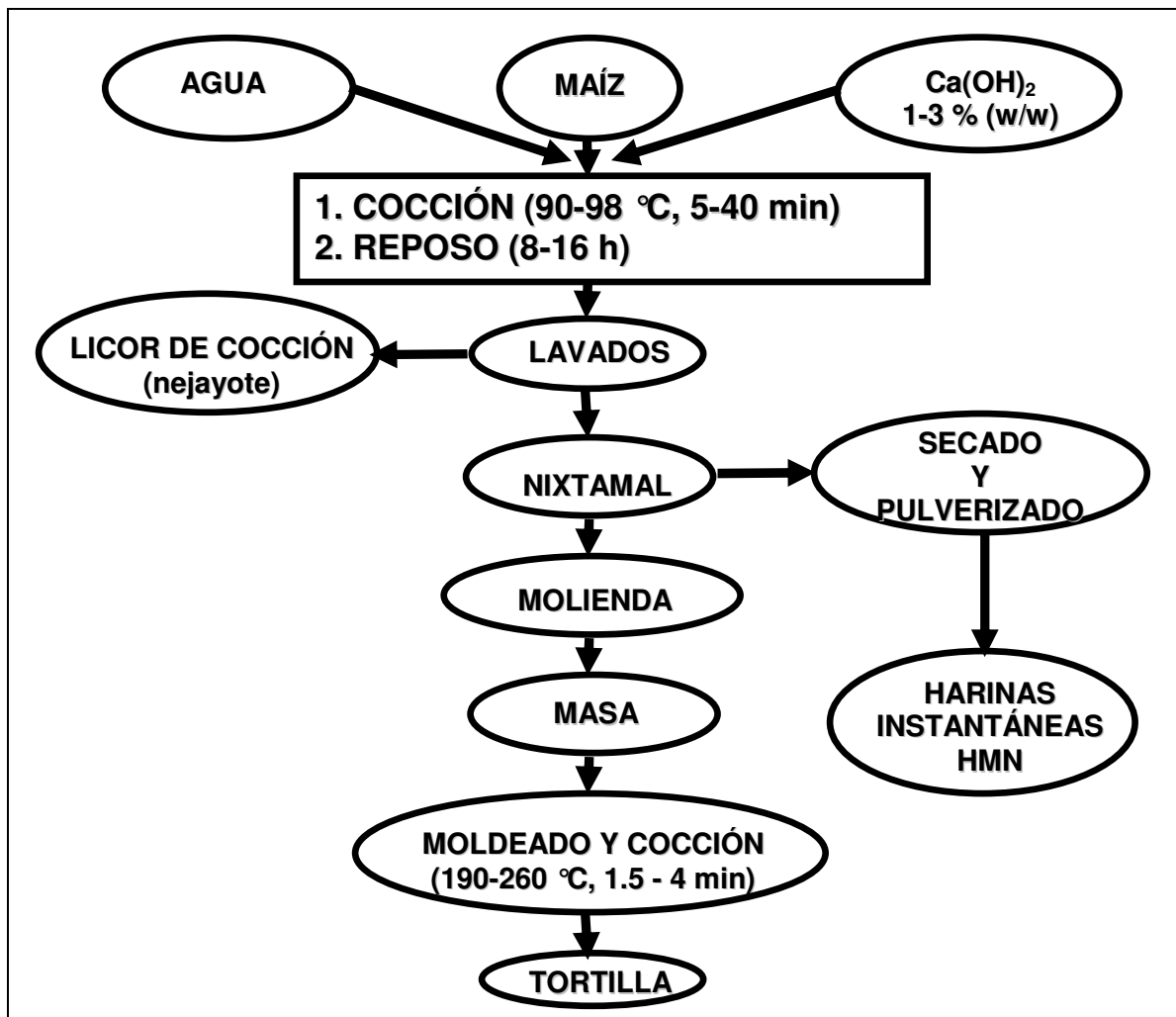


Figura 5. Proceso tradicional de nixtamalización. Adaptado de Bressani (1997).

Las diferencias reportadas en el proceso están asociadas con la cantidad de agua y Ca(OH)_2 (hidróxido de calcio) utilizados, así como con los tiempos de cocción y de reposo. El maíz sometido al tratamiento térmico alcalino da como producto esencial la masa, la cual se transforma en diversas formas, incluyendo la tortilla, su forma principal.

El proceso tradicional de nixtamalización involucra la adición de una parte de maíz y aproximadamente dos partes de solución de Ca(OH)_2 al 1% (w/w). La mezcla se calienta a 80 °C durante 20 a 45 minutos, dejándola reposar durante la noche (8-14 horas). Al día siguiente, el líquido de cocción conocido como *nejayote* (de color amarillo

lechoso), se elimina y el maíz remojado se lava dos o tres veces con agua limpia para remover el pericarpio y la cofia, además de eliminar el exceso de cal. Al maíz cocido, reposado en agua con Ca(OH)_2 y lavado se le llama **nixtamal** y de ahí el nombre de **nixtamalización**. El proceso de cocción en presencia de Ca(OH)_2 , el remojo y el lavado, ayudan a la remoción de la cáscara del maíz. Los subproductos obtenidos de este proceso se descartan. La conversión del nixtamal a masa se realiza moliendo el primero en un molino provisto de dos piedras volcánicas concéntricas y acanaladas. Se colocan luego alrededor de 50 gramos de masa en una prensa o se moldea manualmente para formar las tortillas, que se cocinan en un plato caliente de hierro o de barro, llamado **comal**. En Centroamérica el proceso se realiza de manera similar, pero con algunas modificaciones en donde se utiliza maíz blanco o amarillo, una concentración de Ca(OH)_2 , que varía de 0.17 a 0.58 %, con base en el peso del maíz, con una proporción de grano:agua de 1:1.2, en tanto que el tiempo de cocción varía de 46 a 67 minutos, a una temperatura de 94 °C, dependiendo de la altura sobre el nivel del mar (Bressani *et al.*, 1958). El resto del proceso es esencialmente el mismo que el descrito por Illescas (1943), excepto que la preparación de la masa se realiza con una piedra de moler o en un molino de discos.

2.2.2 Procesos industriales para la producción de harinas instantáneas

Con fines prácticos, el proceso industrial para elaborar harinas instantáneas de maíz nixtamalizado, se basa en el proceso tradicional de nixtamalización. En estos procesos se utilizan granos de maíz semi-duro o duro con un contenido de humedad entre 10 y 12 %. El grano es sometido a un proceso de limpieza, en el cual ocurren pérdidas del 3 al 4 %. Al maíz limpio se le añade agua (1:1.8 w/v) e hidróxido de calcio (5-6 % w/w) y se somete a un calentamiento rápido al interior de un tornillo sin fin, cuya temperatura oscila entre 72 y 95 °C por un periodo entre 30 y 50 minutos. Posteriormente, esta mezcla se deja reposar entre 60 y 120 minutos, consecutivamente se lava. El líquido de cocción y el agua de lavado se descartan y el grano cocido (nixtamal) es molido y secado de manera simultánea en un separador ciclónico para enfriar y separar el granulado; el producto fino se recupera y las partículas gruesas se muelen en un sistema cerrado, en donde se clasifican las partículas para obtener una distribución de tamaño característica. Finalmente, el producto se empaqueta y se almacena para su distribución. El rendimiento estimado de harina nixtamalizada varía entre 900 y 950 g por 1 kg de maíz crudo con un contenido de humedad similar entre ambos (Bressani, 1997).

La principal desventaja de las harinas nixtamalizadas industrialmente radica en una menor calidad de los productos elaborados respecto al sabor y la textura comparados con los productos tradicionales (Gómez *et al.*, 1996).

2.3 CAMBIOS ESTRUCTURALES Y EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GRANO DE MAÍZ SOMETIDO AL TRATAMIENTO TÉRMICO ALCALINO

La conversión del maíz en masa y posteriormente en tortilla involucra, como ya se mencionó anteriormente, un proceso en el cual además del tipo de maíz, participan la adición de agua, de hidróxido de calcio, un tratamiento térmico, períodos de remojo y la acción de la molienda. Estos factores inducen cambios en la estructura del grano, en su composición química, en sus propiedades de funcionalidad y en su valor nutrimental.

Los cambios en la composición química son el resultado de la pérdida de ciertas estructuras físicas del grano y de compuestos químicos inducida por el agua, el pH (potencial de hidrógeno) alcalino del líquido de cocción. También influyen, el tiempo de cocción y remojo, así como las temperaturas aplicadas en las diferentes fases del procesamiento.

Las modificaciones en la funcionalidad promovidos por los factores indicados, consisten básicamente en la pérdida de compuestos orgánicos que conforman la fibra, la gelatinización parcial de los almidones y la desnaturalización de las proteínas.

Por otra parte, los cambios en el valor nutrimental causados por el procesamiento son más complejos e incluyen pérdidas en ciertos nutrimentos, aumento en otros y cambios en la biodisponibilidad de ellos (Paredes *et al.*, 2000).

2.3.1 Cambios estructurales en el grano de maíz nixtamalizado

La cocción alcalina del maíz asociada al remojo en un medio alcalino origina un rompimiento parcial del pericarpio, que se remueve fácilmente con una simple frotación y lavado del grano. La eliminación del pericarpio facilita la absorción de agua y de calcio, ya que representa la primera barrera a este proceso. El pH alcalino solubiliza y desintegra esta estructura, contribuyendo a darle a la masa características de suavidad y plasticidad. La remoción parcial de esta estructura anatómica del grano de maíz, en conjunto con otras alteraciones que sufre el endospermo fue estudiado con algún detalle por Paredes y Saharopulos (1982) y Gutiérrez *et al.* (2007) utilizando microscopía electrónica de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy). De acuerdo con estos autores, la cocción alcalina

induce un aumento en la turgencia y debilitamiento de la pared celular y de los componentes de la fibra, debido a la absorción de agua, lo que permite y facilita la eliminación del pericarpio. Ésta se inicia durante la cocción, continúa durante el remojo del grano y se completa durante el lavado del maíz cocido para obtener el nixtamal. El peso seco del grano de maíz disminuye con el tiempo de cocción, este comportamiento puede ser debido a pérdidas de materiales orgánicos que emergen del grano al medio de cocción. El incremento en peso es debido posiblemente a la absorción del calcio que se inicia durante la cocción y continúa durante la fase de remojo. La capa de aleurona y sus células quedan intactas y adheridas a la superficie del endospermo, fungiendo como una estructura de retención del mismo (Bjarnason y Palmer, 1972). Posiblemente, debido a la característica de semipermeabilidad de la capa de aleurona, se reduce la pérdida de proteínas del endospermo y el nitrógeno que se pierde podría ser de proteínas de muy bajo peso molecular (Paredes y Saharopulos, 1982; Serna *et al.*, 1990).

La *lamela* media y paredes celulares del endospermo externo son parcialmente destruidas y solubilizadas. Por otro lado, la mayor parte del germen se retiene durante la cocción alcalina, lo cual es importante, ya que con ello se retiene la calidad proteínica del grano de maíz (Bjarnason y Palmer, 1972).

Los gránulos de almidón fuertemente compactados por la matriz proteínica, absorben agua y aumentan de tamaño en todo el endospermo mostrando una destrucción parcial, lo que transforma la organización estructural de la amilosa y la amilopectina. Los cambios estructurales del almidón están asociados al fenómeno de **gelatinización**, el cual ocurre cuando la estructura molecular de los gránulos de almidón se modifica, a través de su calentamiento en presencia de agua (Atwell *et al.*, 1988). Por su parte, las proteínas de esta estructura del grano permanecen asociadas a los gránulos de almidón (Gómez *et al.*, 1989; Serna *et al.*, 1990). Así mismo, se ha indicado que ocurren cambios en la apariencia física de los cuerpos proteicos en algunas regiones del endospermo (Gómez *et al.*, 1987), en tanto que el almidón está parcialmente gelatinizado (Chang y Hsu, 1985). De acuerdo con Robles *et al.* (1988), la cocción alcalina y el remojo del maíz en agua induce aumentos significativos en la viscosidad de la masa; sin embargo, estos autores no encontraron que la nixtamalización ocasione una gelatinización total del almidón.

Gómez *et al.* (1991,1992) señalan que el proceso de nixtamalización produce cambios poco significativos en la organización de los polímeros del almidón. Estos autores también estudiaron el maíz crudo, nixtamal, masa, tortilla y totopos mediante

patrones de difracción de rayos X, indicando que durante la cocción del grano se reduce la intensidad de los picos más pronunciados en los difractogramas, concluyendo que la estructura cristalina del almidón se destruye parcialmente. En estos trabajos, los investigadores analizaron el grano de maíz entero, razón por la cual los cambios en algunas estructuras del endospermo con una localización particular no fueron observados, tampoco detectaron la presencia de zonas amorfas en los patrones de difracción, ya que estudiaron el grano considerándolo como un sistema homogéneo.

Sahai *et al.* (1999) reportaron que la calorimetría diferencial de barrido o DSC (Differential Scanning Calorimetry), es una técnica que puede ser empleada como un indicador para determinar el grado de gelatinización del almidón de maíz durante el tratamiento térmico alcalino, así como para evaluar el impacto de las condiciones del proceso en los productos nixtamalizados. Krueger *et al.* (1987), Robles *et al.* (1988) y Sahai y Jackson (1999), sugieren que la temperatura del pico endotérmico y los valores de entalpía obtenidos para muestras de maíz nixtamalizado, se modifican con el tiempo de reposo debido al fenómeno de templado (annealing) que tiene lugar a temperaturas cercanas a la gelatinización del almidón. Yglesias *et al.* (2005) reportaron que el valor de la entalpía del almidón en el nixtamal, es mayormente afectado por el tiempo de reposo, mientras que la temperatura de cocción repercute en el valor de la entalpía del almidón en la masa. Es importante mencionar, que todos estos trabajos se llevaron a cabo considerando al grano de maíz como un sistema uniforme, sin tomar en cuenta que está integrado por estructuras anatómicas con una composición química diferente, por lo tanto, las interacciones de cada uno de sus constituyentes químicos con el calcio serán distintas. Adicionalmente, ninguno de estos investigadores evaluaron la relación entre el contenido de calcio y el pico de entalpía obtenido en los productos nixtamalizados.

Rojas *et al.* (2007) demostraron que mediante el análisis de difracción de rayos X del almidón de maíz y de sus componentes (amilosa y amilopectina), es posible monitorear los cambios estructurales en el endospermo del maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino. Este aspecto resulta relevante desde el punto de vista nutricional dado que estas modificaciones también involucran a las proteínas de la matriz proteínica que recubre a los gránulos de almidón. Estos autores presentaron los patrones de difracción de rayos X de la amilosa, amilopectina y del almidón de maíz (Figura 6) en donde observaron que ambas moléculas exhiben los patrones de difracción del almidón tipo A propio de los cereales, en donde se detectaron dos picos característicos cuyos valores fueron de 15.21° y 23.2° , además de un doblete a 17.5° (escala 2θ). Imberty *et*

al. (1988) y *Qi et al.* (2005) también detectaron estos picos en los difractogramas obtenidos para almidón de maíz extraídos de variedades de maíces normales y cerosos, es decir, con alto contenido de amilopectina.

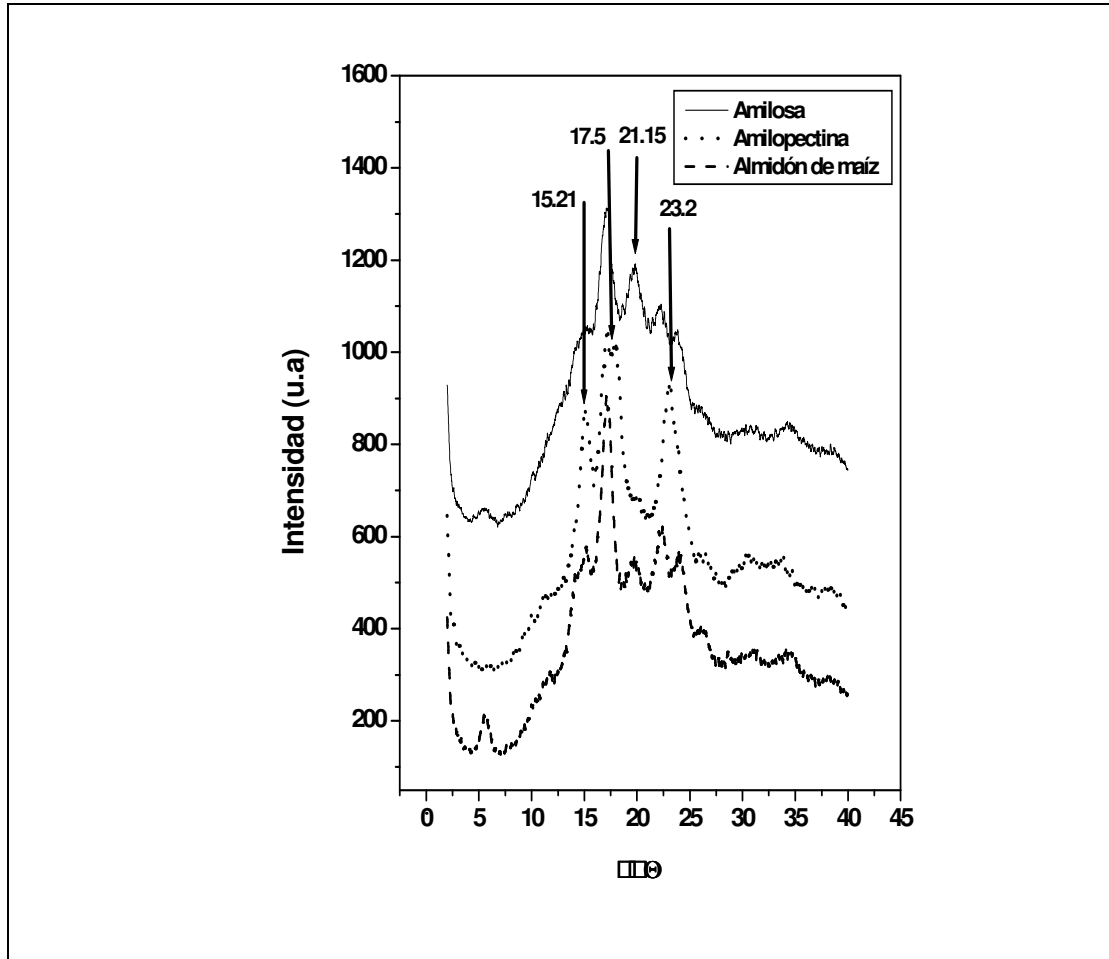


Figura 6. Patrones de difracción de rayos X característicos de la amilosa, amilopectina y almidón de maíz (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

En el caso de la amilosa *Rojas et al.* (2007) detectaron un pico a 21.15 ° en la escala 2θ , el cual se ha asociado a complejos de amilosa-lípido. Se ha reportado que la intensidad de este pico se incrementa cuando el contenido de amilosa aumenta (*Zobel et al.*, 1988). *Rojas et al.* (2007) demostraron que los picos de la amilopectina se definen mejor (Figura 6) y que la calidad cristalina de esta estructura es mayor con respecto a la amilosa, ya que los valores de la **crystalinidad relativa** de la amilopectina y amilosa resultaron de 37 y 22 %, respectivamente.

Con relación al punto anterior, Rojas *et al.* (2007) también mostraron el patrón de difracción de rayos X del endospermo vítreo y del endospermo harinoso del maíz QPM H-368 (Figura 7).

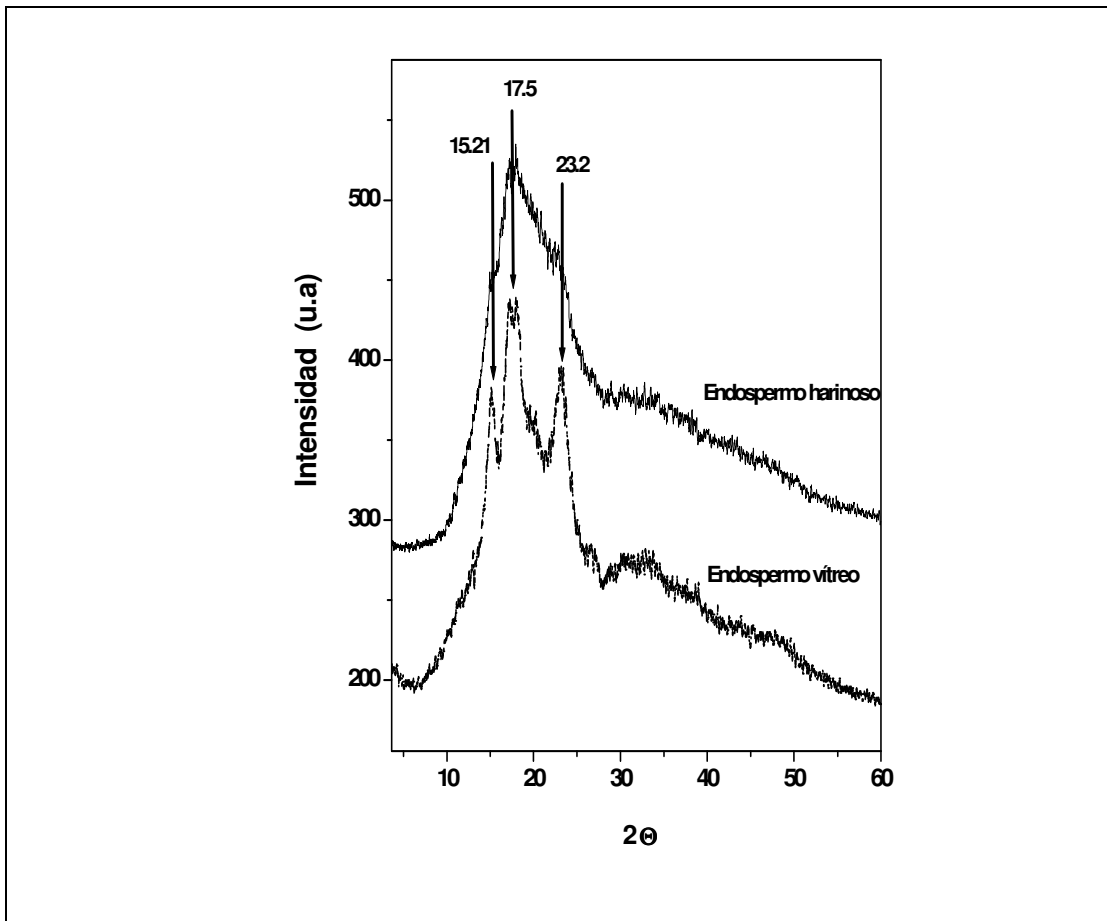


Figura 7. Patrones de difracción de rayos X característicos del endospermo vítreo y harinoso del maíz QPM H-368 nativo (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

Rojas *et al.* (2007) observaron que el endospermo vítreo presentó una mayor cristalinidad (25.2 %), es decir, una estructura molecular más ordenada, con respecto a la del endospermo harinoso (19.1 %). La mayor calidad cristalina se puede apreciar en los picos definidos señalados con flechas (Figura 7), lo cual indica que el endospermo vítreo está constituido en su mayor parte por amilopectina. A este respecto, Qi *et al.* (2005) observaron que la cristalinidad del almidón disminuye cuando el contenido de amilosa se incrementa, confirmando que esta característica es predominantemente una función del contenido de amilopectina y no de la amilosa, evidenciando con ello que los maíces QPM son abundantes en amilopectina. Rojas *et al.* (2007) también presentaron los patrones de

difracción característicos del endospermo de maíz nativo o crudo (Figura 8).

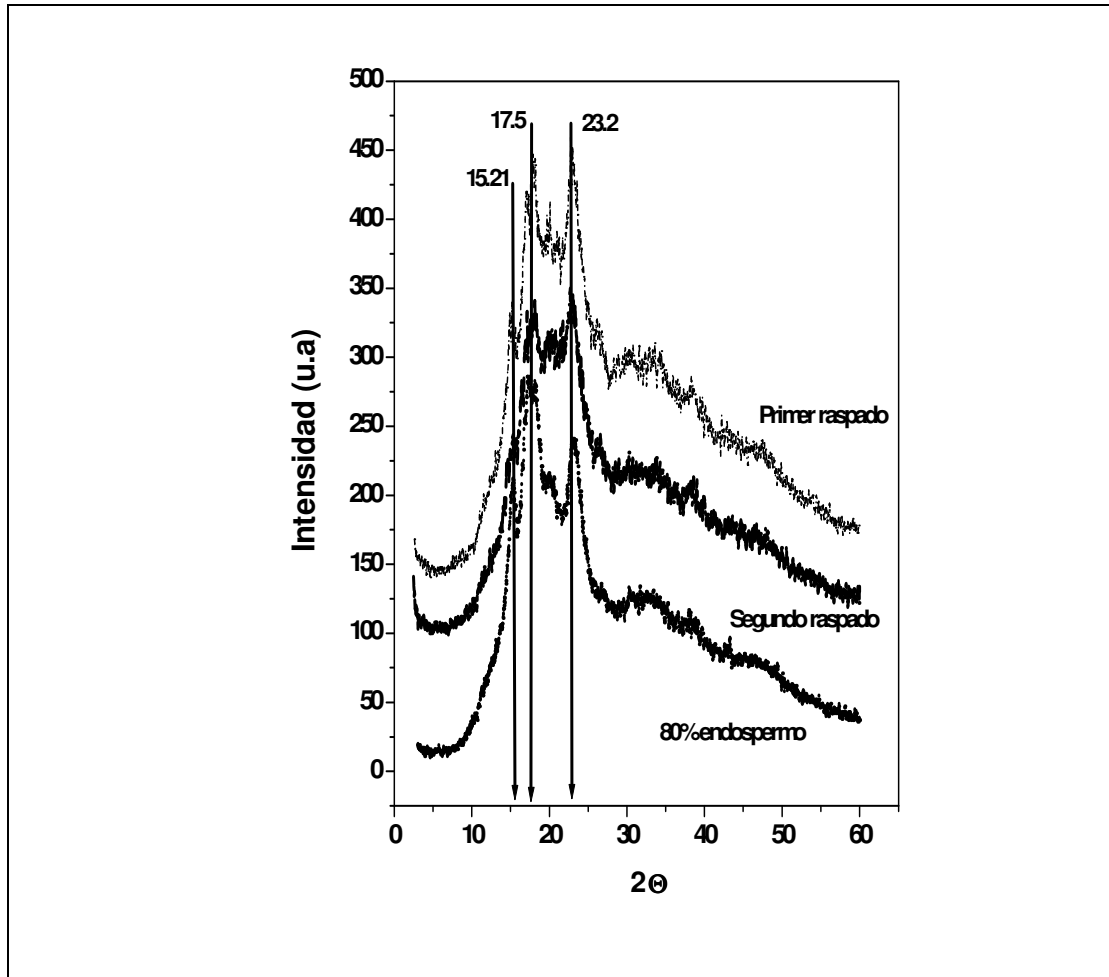


Figura 8. Patrones de difracción de rayos X del primer raspado (10 % w/w del peso total del endospermo), del segundo raspado (10 % w/w consecutivo) y del 80 % remanente del grano de maíz nativo (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

Los patrones de difracción de la Figura 8 corresponden al 10 % (w/w) de las capas más externas del endospermo (primer raspado), al subsiguiente 10 % (segundo raspado) y a las capas más internas (80 % remanente), los cuales son característicos de un material cristalino que en este caso es la amilopeptina (Figura 6). Es importante señalar que estos datos son evidencia de que el estudio de las modificaciones estructurales, físicas, químicas y nutrimentales del grano de maíz nixtamalizado, específicamente del endospermo en donde se localiza el 81 % de la proteína de este cereal, debe realizarse considerándolo como un sistema multicapa, es decir, en forma estratificada.

Durante la etapa de cocción y de reposo del proceso de nixtamalización ocurre una difusión simultánea de agua y de iones de calcio hacia el interior del grano. Entonces, resulta razonable suponer que las capas más externas del endospermo experimenten los cambios iniciales. Estas transformaciones pueden reflejarse en la estructura de los gránulos de almidón, en las transiciones de fase de la gelatinización del almidón y en las estructuras que los circundan como son la matriz proteínica y los cuerpos proteínicos embebidos en ella.

Por otra parte, Rojas *et al.* (2007) también mostraron los patrones de difracción de rayos X de las capas más externas del endospermo (10 % w/w del peso total del grano o primer raspado), del siguiente 10 % y del 80 % remanente separados de los granos de maíz nixtamalizados (Figura 9). Estos autores detectaron que el 20 % de las capas más externas del endospermo mostraron una modificación en la estructura cristalina del almidón de maíz, que se evidenció en los patrones de difracción de rayos X, los cuales corresponden a un material amorfo.

Con respecto a los patrones correspondientes al 80 % remanente, es decir, de las capas más internas del endospermo, permanecieron intactos ya que presentan los patrones característicos de un material cristalino (Figura 8), mismos que corresponden a la amilopectina. Rojas *et al.* (2007), también observaron que la pérdida de la cristalinidad del almidón tiene lugar desde la etapa de cocción del grano de maíz, ya que a partir de las 0 h de reposo, los patrones de difracción característicos de la amilopectina no se detectaron.

Las condiciones bajo las que se lleva a cabo el proceso de nixtamalización, sugieren que el fenómeno de **templado (annealing)** pudiera desarrollarse durante la etapa de reposo del grano, particularmente, en los tiempos de reposo prolongados. Uno de los efectos del fenómeno de templado consiste en la fusión parcial de cristales presentes en el gránulo de almidón, con un reordenamiento de las cadenas de los polímeros dentro del gránulo, esto implica que el sistema recupera o incrementa su calidad cristalina, es decir, ocurre una **recristalización**. Con base en lo anterior, Rojas *et al.* (2007) concluyeron que tanto en las capas externas como internas del endospermo, el fenómeno de anillado no tiene lugar en las muestras experimentales, ya que por una parte, su calidad cristalina no se recupera y por otro lado, tampoco se incrementa.

Adicionalmente, estos autores mencionan que para que se lleve a cabo el templado, son necesarios la presencia de agua (40 % w/w) y tiempos muy prolongados de incubación. Con relación a este punto, Ramos *et al.* (2004) demostraron que existe

una menor difusión de agua en las capas internas del endospermo del grano de maíz. También se ha reportado que las partículas que constituyen el endospermo vítreo, requieren de un periodo mayor con respecto al endospermo harinoso para que se lleve a cabo la hidratación y gelatinización del almidón (Almeida-Domínguez *et al.*, 1998).

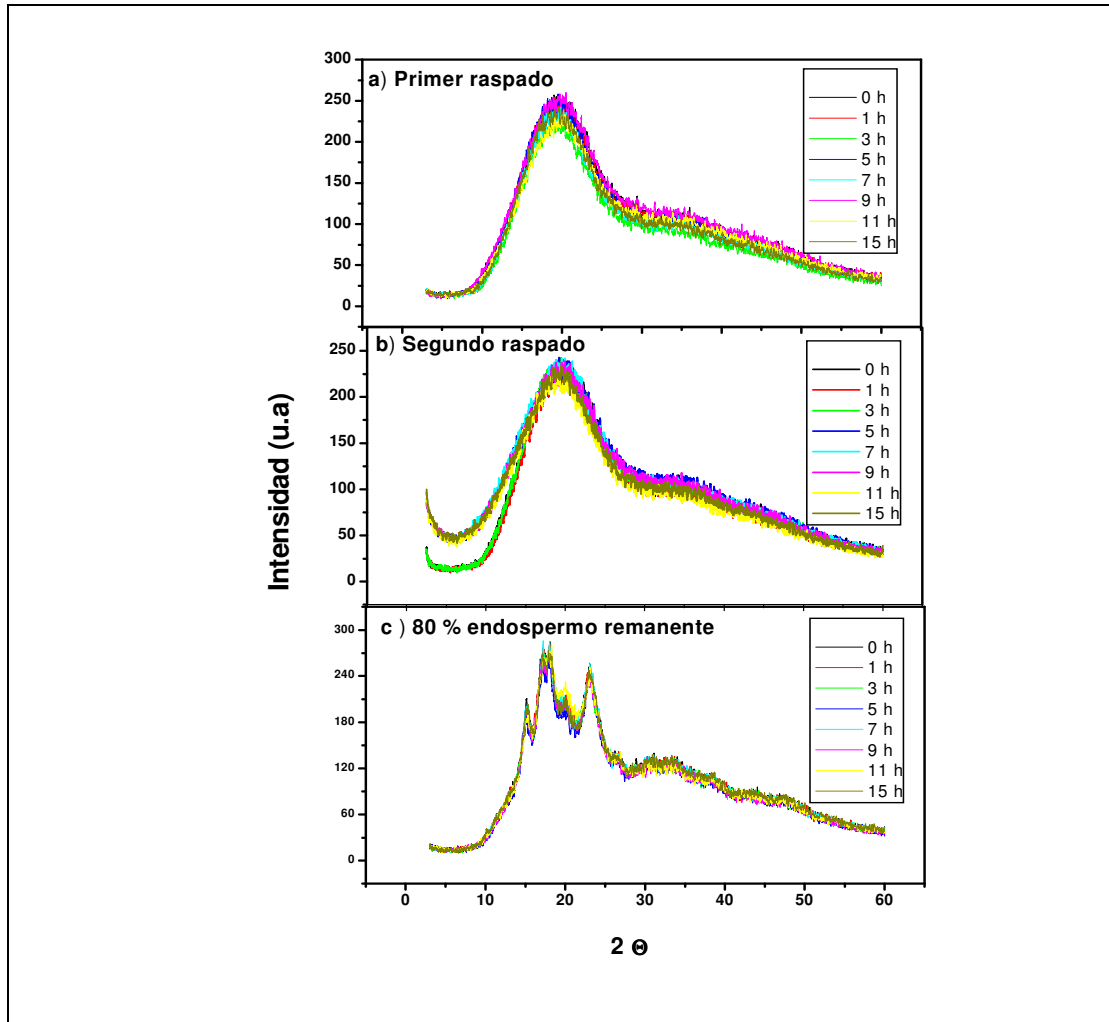


Figura 9. Patrones de difracción de rayos X del a) primer raspado b) segundo raspado y c) 80 % remanente del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

Rojas

2.3.2 Cambios en la composición química del grano de maíz nixtamalizado

Se han reportado varios estudios relacionados con los cambios químicos y por lo tanto, en el contenido de nutrimentos ocurridos durante el tratamiento térmico alcalino del

maíz (Cravioto *et al.*, 1945; Bressani y Scrimshaw, 1958; Saldana y Brown, 1984; Pflugfelder *et al.*, 1988a; Serna *et al.*, 1988a; Weber *et al.*, 1993).

En la Tabla 2 se presenta una síntesis de los cambios que experimenta el maíz por efecto del proceso de nixtamalización. En el caso de las proteínas, se observa que este método empleado para la transformación del maíz disminuye el contenido, la solubilidad, la digestibilidad y la utilización proteínica neta (porcentaje de nitrógeno consumido que es transformado en nitrógeno corporal o NPU). No obstante, la eficiencia proteínica relativa (ganancia en peso corporal con respecto a la proteína ingerida o PER) aumenta significativamente, lo cual implica un mejor aprovechamiento de la proteína. Estos y otros aspectos se presentan con mayor detalle en las siguientes secciones.

La nixtamalización también reduce el contenido de almidón; sin embargo, incrementa el contenido de fibra soluble y de almidón resistente con la consecuente contribución a la salud humana.

Con relación a las vitaminas, en general el proceso de nixtamalización disminuye el contenido de éstas, pero incrementa la disponibilidad de la niacina disminuyendo los riesgos de padecer pelagra.

Así mismo, el maíz nixtamalizado contribuye de manera importante con la ingesta de calcio, ya que aumenta los niveles de este mineral y lo hace biodisponible. De igual manera, el ácido fítico disminuye en forma importante permitiendo que la absorción de los minerales se incremente.

Otra aportación importante del proceso de nixtamalización es la disminución en el contenido de aflatoxinas, si éstas se encuentran presentes (De Arriola *et al.*, 1988; Carvajal *et al.*, 2000; Méndez *et al.*, 2004). Todos estos aspectos son evidencia de que el maíz nixtamalizado tiene una aportación nutrimental a la dieta humana más importante, comparada con la del maíz cuando se consume sin ser sometido a este proceso (Paredes *et al.*, 2000).

De la misma manera, es importante señalar que las pérdidas de nutrimentos en el maíz nixtamalizado están asociadas con la pérdida de materia seca, la cual es de alrededor del 15 %, pero esto depende de la integridad del grano de maíz, de la variedad de maíz y de la presencia de materia extraña. Lo anterior explica la variabilidad en las pérdidas entre el maíz crudo y cocido desde un 8.9 hasta un 21.3 % reportada por diversos autores (Bressani *et al.*, 1958; Katz *et al.*, 1974; Bedolla *et al.*, 1983; Morad *et al.*, 1986; Jackson *et al.*, 1988; Pflugfelder *et al.*, 1988b; Serna *et al.*, 1988b; Sproule *et al.*, 1988).

Tabla 2. Modificaciones en el grano de maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino y algunos aspectos ecológicos

	Concepto	Efecto		Concepto	Efecto
Proteína	Contenido	↓	Minerales	Calcio	↑↑↑↑
	Solubilidad	↓		Fósforo	↑↑↑
	Digestibilidad	↓		Relación Ca/P	↑↑↑
	Relación de eficiencia de proteína (PER)	↑↑	Hierro	↓↓	
	Valor biológico (VB)	↑↑	Otros	Ácido fítico	↓
	Utilización neta de proteína (UNP)	↓		Aflatoxinas	↓↓↓
	Aminoácidos	Lisina	↓	Aleurona del grano Permanece durante la nixtamalización, lo que disminuye la lixiviación de nutrientes	
Triptófano		↓	Aspectos ecológicos 1 kg de maíz implica enviar a los efluentes de 3 a 10 L de agua contaminada		
Leucina		↓	Sabor, textura y aspecto ↑↑↑↑		
Aminoácidos disponibles		↑↑	Temperatura: 72-92 °C Ca(OH)₂: 1-3 % (w/w) Reposo: 6-24 h		
Relación leucina/ isoleucina		↑↑			
Carbohidratos	Almidón	↓			
	Fibra total	↓↓			
	Soluble	↑			
	Insoluble	↓			
	Almidón resistente	↑↑			
Lípidos		↓			
Vitaminas	Provitamina A	↓↓			
	Tiamina (B1)	↓↓			
	Riboflavina (B2)	↓↓			
	Niacina (B3)	↓			
	Niacina disponible	↑↑↑			

↑: incremento; ↓: disminución. El número de flechas indica esquemáticamente el nivel del incremento o disminución. Adaptado de Paredes *et al.* (2000).

2.4 MODIFICACIONES EN LAS PROTEÍNAS DEL MAÍZ NIXTAMALIZADO

2.4.1 Cambios en la solubilidad de las fracciones proteínicas del grano de maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino

Con respecto a este punto, se ha demostrado que la solubilidad de las zeínas, albúminas y globulinas en los solventes de extracción empleados durante su

fraccionamiento por el método de Landry-Moureaux (1970), disminuye significativamente en el maíz nixtamalizado comparado con el grano crudo (Bressani y Scrimshaw, 1958; Trejo *et al.*, 1982; Ortega *et al.*, 1986; Sproule *et al.*, 1988).

Con relación a las modificaciones en el contenido de proteína en la fracción de las glutelinas y el residuo (remanente del proceso de extracción proteínica) durante la transformación del maíz en tortillas, Trejo *et al.* (1982) reportaron una reducción en el porcentaje de la proteína recuperada en las glutelinas. Por el contrario, observaron un incremento en el contenido de proteína en el residuo. Posteriormente, Ortega *et al.* (1986) detectaron un incremento en el contenido de proteína en la fracción de glutelinas y en el residuo en muestras de nixtamal, masa y tortilla con respecto al maíz sin procesar.

Vivas *et al.* (1987) demostraron mediante un análisis electroforético, la pérdida de proteínas solubles en solución salina en el grano de maíz normal después de ser sometido al proceso de nixtamalización, especialmente en aquellas con bajo peso molecular (debajo de 12 kDa). Estos autores también observaron una reducción en la intensidad de las bandas correspondientes a la fracción de prolaminas. Este mismo grupo, reportó la presencia de proteínas de mayor peso molecular en el nixtamal y la masa de maíz en los patrones electroforéticos pertenecientes a las glutelinas.

Se ha sugerido que durante el procesamiento del maíz con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ las interacciones hidrofóbicas, la desnaturalización y el entrecruzamiento de las proteínas del grano son probablemente responsables de los cambios en la solubilidad de las proteínas (Sanderson *et al.*, 1978; Paredes y Saharapulos, 1983; Ortega *et al.*, 1986).

Acorde con Bressani (1997) esta información podría ser útil como un método para evaluar el grado de cocción alcalina del maíz, así como para poder asociar los cambios en la solubilidad de las proteínas con las características de funcionalidad de la masa y de la tortilla.

2.4.2 Efecto de la nixtamalización en la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado

El valor nutrimental de una proteína depende de su capacidad para proporcionar la cantidad de nitrógeno y de aminoácidos, de tal manera que pueda cubrir con los requerimientos de un organismo. En teoría, el método más apropiado para evaluar la **calidad proteínica** de un alimento, consiste en comparar su contenido de aminoácidos (tomando en cuenta su biodisponibilidad) con el requerimiento de aminoácidos del organismo humano. Por esta razón, se han llevado a cabo un gran número de

comparaciones utilizando patrones de referencia, tales como aquellos derivados de la proteína del huevo y de la leche. Sin embargo, las principales modificaciones en los métodos de evaluación consisten en la sustitución de un patrón provisional de los requerimientos por un estándar de la proteína del huevo (FAO/WHO, 1991).

Por otra parte, la calificación química (CQ) de una proteína se determina tomando en cuenta el aminoácido limitante. Este parámetro se calcula con la siguiente fórmula:

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácido por g de proteína prueba}}{\text{mg de aminoácido por g de proteína en el patrón de referencia (huevo)}}$$

o

$$CQ = \frac{\text{mg de aminoácido por g N en la proteína prueba}}{\text{mg de aminoácido por g de N en el patrón de referencia (huevo)}}$$

Se ha propuesto una proteína hipotética de referencia, derivada del patrón del requerimiento de aminoácidos por el organismo humano como estándar de comparación. De la misma manera, se han realizado algunas pruebas y ensayos con reconocimiento científico, a fin de evaluar de manera inequívoca el requerimiento de aminoácidos en el ser humano. Así, mismo existen algunas dificultades para cuantificar correctamente el contenido aminoácidos en los alimentos que constituyen una fuente de proteína (FAO/WHO, 1991).

Como resultado de lo anteriormente señalado, y con el propósito de perfeccionar los procedimientos para calcular la calificación química de un alimento, ésta generalmente se corrige con la **digestibilidad** (proporción de nitrógeno que es absorbido y retenido por el organismo) y con factores de disponibilidad biológica como la eficiencia proteínica relativa o **PER** y la utilización proteínica neta o **NPU**, en ambos casos, se compara con una proteína estándar como la proteína del huevo o la caseína (Pellet y Young, 1980).

Los métodos empleados para determinar el contenido de **lisina químicamente disponible o reactiva** en los alimentos procesados y en materias primas, dependen de una reacción con el fluorodinitrobenceno (FDNB) o reactivos similares como colorantes del tipo azo, por ejemplo, el naranja ácido 10' (Orange G), el naranja ácido 12' (AO-12) y el 1-fenilazo-2 naftol-6 ácido sulfónico. Éstas técnicas han sido ampliamente utilizadas

para el control de calidad, así como para evaluar los efectos de los procesos empleados en la transformación de los alimentos (Carpenter, 1973). El contenido de lisina reactiva es considerado como un indicador de la calidad proteínica en los alimentos procesados, en virtud de que algunos tratamientos térmicos afectan al aminoácido lisina, dando lugar a una reducción en la capacidad de las proteínas para unirse a los reactivos colorantes tipo azo (Hurrell y Carpenter, 1975).

Con respecto a las modificaciones en la calidad proteínica del maíz sometido al tratamiento térmico alcalino, Bressani y Scrimshaw (1958) reportaron pérdidas de arginina (18.7 %), histidina (11.7 %), lisina (5.3 %), leucina (21 %) y cistina (12.5 %). No obstante, detectaron a través de estudios enzimáticos *in vitro*, que la liberación del nitrógeno α -amino fue más rápida en la tortilla que en el maíz crudo.

Trejo *et al.* (1982) señalaron que el proceso de nixtamalización, aumenta el contenido de lisina disponible en el maíz. Ortega *et al.* (1986) observaron pérdidas mínimas de triptófano y lisina en el maíz normal y en el maíz QPM transformado en tortilla con respecto al maíz crudo. Por otra parte, describen un ligero incremento en el contenido de lisina (6 %) en el nixtamal del maíz normal comparado con el grano no procesado. Estos autores señalan que el contenido de lisina disponible en el maíz se reduce durante el proceso de nixtamalización.

Los trabajos relacionados con la modificación en la digestibilidad de la proteína del maíz nixtamalizado, Serna *et al.* (1987) reportan una reducción en la digestibilidad del nitrógeno del maíz procesado con respecto al crudo, la cual se evaluó en cerdos canalizados en la porción terminal del intestino delgado desde un 76.5 hasta un 72.8 %. Sin embargo, la digestibilidad del nitrógeno se incrementó cuando se canalizó la porción intestinal total, concluyendo que la nixtamalización reduce el valor nutritivo del maíz. Serna *et al.* (1988a) observaron una disminución en la digestibilidad de la proteína en ratas alimentadas con nixtamal y tortilla, los valores obtenidos correlacionaron con estudios *in vitro*. Sproule *et al.* (1988) también detectaron una disminución en la digestibilidad de la proteína en el nixtamal y la tortilla.

Posteriormente, Bressani *et al.* (1990) al evaluar las transformaciones del maíz transformado en tortilla mediante procedimientos de elaboración tradicional, observaron pérdidas de lisina en nixtamal (1-4 %) y tortillas (8.2 %) de maíz normal. Por el contrario, reportaron un incremento de este aminoácido en el nixtamal del maíz QPM *Nutricta* (3.1 %) y en las tortillas de maíz normal (5.4 %). También detectaron pérdidas de triptófano del 28 % en el maíz normal y del 26 % en el maíz QPM *Nutricta*. Estos investigadores

demonstraron que el crecimiento en ratas alimentadas con tortilla fue mayor, con respecto a aquellas sometidas a una dieta a base de maíz crudo. Sin embargo, no pudieron explicar el incremento de lisina observado y la pérdida tan significativa de triptófano.

2.4.3 Relación del calcio con la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado

Es de interés mencionar que los aminoácidos esenciales que determinan la calidad de la proteína del maíz son en orden de importancia, la lisina, el triptófano, la isoleucina y la treonina (Bressani *et al.*, 1968).

La leucina que está presente en exceso, puede afectar la calidad de la proteína interfiriendo con la utilización de la isoleucina y posiblemente de la valina, ya que son similares en su estructura química (Bressani *et al.*, 1968).

De Groot y Slump (1969) demostraron que un tratamiento térmico alcalino severo a las proteínas, inducía la formación de péptidos como la lisino-alanina (LAL), la lantoina y la ornitina. Todos estos compuestos tienen efectos negativos en animales experimentales, no son biológicamente disponibles y disminuyen la calidad de la proteína. La lisino-alanina se forma por condensación de la lisina con la dehidro-alanina, esta última, es producto de la degradación de la cistina y la serina bajo condiciones alcalinas.

Por lo anterior, el efecto del proceso de cocción alcalina para convertir el maíz en tortilla, ha recibido alguna atención por parte de varios investigadores como se menciona a continuación.

Steinberg *et al.* (1975) reportaron que muestras comerciales de harina de masa, tortillas y base para tacos contenían 480, 200 y 170 µg/g de LAL respectivamente.

Sanderson *et al.* (1978) demostraron que la lantoina y la orinitina se formaban durante la cocción alcalina del maíz, como productos de degradación de los aminoácidos cistina y arginina. Estos autores no detectaron LAL en maíz común y maíz QPM crudo. Sin embargo, informaron que el valor de LAL fue de 0.59 y 0.049 g/100 g de proteína en masa de maíz común y QPM, respectivamente. También observaron que una masa comercial contenía 0.02 % y las tortillas 0.081 % de LAL en base a la proteína.

Chu *et al.* (1976) reportaron valores de 133.2 µg de LAL por gramo de proteína, cuando el maíz fue procesado con 4.1 mol/kg de Ca(OH)₂, durante 30 minutos a 76 °C. La utilización de hidróxido de sodio bajo condiciones iguales mostró niveles más altos de LAL. Por el hecho de que los niveles más elevados de LAL se obtuvieron con NaOH y

KOH, los autores sugirieron que los iones de calcio pueden de alguna manera, interferir con el mecanismo de formación de la lisino-alanina.

Finalmente, Bressani (1990) reportó que la cantidad de Ca(OH)_2 empleada durante el proceso, está directamente relacionada con la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado, y por lo tanto, con la cantidad de calcio que se incorpora al grano.

3. JUSTIFICACIÓN

Los cereales proporcionan aproximadamente el 50 % de la proteína en la dieta de los seres humanos y en los países en vías de desarrollo como México, más del 70 % de la ingesta proteínica entre la población rural y económicamente más vulnerable, provienen de estas gramíneas. Se estima que la demanda de cereales continuará incrementándose en los próximos años, como resultado del aumento en la población mundial (Lutz y Goujon, 2001).

Actualmente, existe una gran dependencia hacia el maíz como alimento básico en América Latina y África; sin embargo, los cereales no representan una fuente de proteínas con un balance adecuado de aminoácidos (Paredes *et al.*, 2000; Sefa-Dedeh *et al.*, 2003). Las proteínas más abundantes en el maíz son las prolaminas y son deficientes en varios aminoácidos, en particular, de lisina y triptófano, los cuales son esenciales para la nutrición humana y animal (Young *et al.*, 1998; Motto *et al.*, 1996). Para tratar de compensar estas deficiencias, en el CIMMYT se desarrollaron las variedades de maíz QPM, las cuales mostraron características similares a las variedades de maíz normal, además de su alto contenido de lisina y triptófano (Villegas *et al.*, 1992; Prasanna *et al.*, 2001).

Los beneficios que desde el punto de vista nutrimental, proporcionan los híbridos de maíz QPM a la población que obtiene su energía y proteínas a partir de este cereal, son altamente significativos. Numerosas investigaciones han demostrado la superioridad en cuanto a la calidad, valor biológico y digestibilidad de las proteínas del maíz QPM con respecto a las variedades de maíz normal (Asche *et al.*, 1986; Serna *et al.*, 1992; Bressani, 1992; 1995; Amaya *et al.*, 2006). En estos trabajos se ha reportado que las proteínas del maíz QPM contienen 55 % más de triptófano, 30 % más de lisina y un 38 % menos de leucina que las variedades de maíz normal. Sin embargo, estas características no las exime de experimentar pérdidas en su contenido de lisina y triptófano durante su procesamiento, como lo es el tratamiento térmico alcalino.

Los trabajos relacionados con las transformaciones estructurales del maíz nixtamalizado, se han llevado a cabo considerando al grano como un sistema uniforme, sin tomar en cuenta que está integrado por estructuras anatómicas con una composición química diferente, por lo tanto, las interacciones de cada uno de sus constituyentes químicos con el calcio serán distintas. Así mismo, en ninguna de estas investigaciones, evaluaron la relación entre el contenido de calcio y el grado de gelatinización del almidón

en el endospermo del grano, así como con las transformaciones en la morfología de esta estructura.

En lo que se refiere a las proteínas, es necesario destacar que dependiendo de la etapa y condiciones del proceso, el comportamiento en cuanto a la digestibilidad de la proteína y al contenido de lisina y triptófano se modifica. Por esta razón, los resultados de los trabajos señalados en los antecedentes contrastan entre sí, lo cual podría atribuirse, en parte, al hecho de que el proceso de nixtamalización no se ha estandarizado. Esto significa que los niveles de las variables que intervienen en este proceso como son la temperatura, la concentración de Ca(OH)_2 y el tiempo de reposo, por mencionar algunas de ellas, son diferentes dependiendo de la región geográfica en donde se lleve a cabo la nixtamalización. Adicionalmente, los autores emplearon condiciones puntuales en el procedimiento y en ninguno de ellos se ha descrito el control de estas variables, como por ejemplo, la temperatura durante la etapa de cocción y de reposo del maíz. Por lo anterior, resulta complicado realizar un análisis comparativo entre las investigaciones publicadas hasta este momento y en consecuencia, tampoco son concluyentes.

Con base en estas consideraciones, resulta evidente que en la actualidad se tiene un conocimiento limitado acerca de las modificaciones en la calidad de la proteína del maíz sometido al tratamiento térmico alcalino y su relación con el calcio. Aunado a lo anterior, no se han reportado estudios sistemáticos, relacionados con las transformaciones en las propiedades térmicas y nutrimentales en el grano de maíz nixtamalizado durante la etapa de reposo, considerándolo como un sistema no-homogéneo.

Por otra parte, es importante enfatizar que los resultados de esta investigación pueden emplearse para identificar las condiciones del proceso de nixtamalización, en donde la digestibilidad de la proteína sea mayor y las pérdidas de lisina y triptófano sean mínimas, ya que no tiene sentido el desarrollo de variedades de maíz con alta calidad proteínica, si ésta se reduce o pierde cuando el maíz es procesado.

Este trabajo tiene como meta a largo plazo implementar nuevas tecnologías tendientes a conservar las ventajas nutrimentales que el maíz QPM aporta a la nutrición humana. Desde esta perspectiva, surgió la presente disertación como parte de un proyecto de investigación interdisciplinario, en donde el planteamiento de la hipótesis y los objetivos se presentan en el siguiente capítulo.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Existen modificaciones en la digestibilidad de la proteína, el contenido de lisina y triptófano en el maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo; las cuales están asociadas a la difusión del calcio al interior del grano. Por lo tanto, hay una correlación entre la concentración de Ca^{2+} y la calidad de la proteína en el grano procesado.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la concentración de calcio y la digestibilidad de la proteína en el grano de maíz QPM H-368 sometido a un tratamiento térmico alcalino, en diferentes tiempos de reposo. Así mismo, cuantificar el calcio, la lisina y el triptófano en diferentes capas del endospermo del maíz objeto de estudio una vez nixtamalizado, en función del tiempo de reposo, para correlacionar la calidad de la proteína con el grado de fijación del calcio en el grano.

4.3 OBJETIVOS PARTICULARES

4.3.1 Establecer los parámetros que definen el tiempo de cocción del maíz objeto de estudio, mediante variables cuantitativas, para estandarizar las condiciones experimentales durante el tratamiento térmico alcalino del grano.

4.3.2 Obtener los perfiles térmicos del grano de maíz durante la nixtamalización a diferentes tiempos de reposo, para evidenciar que el tratamiento térmico alcalino fue análogo en todas las muestras experimentales.

4.3.3 Determinar el contenido de lisina, lisina reactiva, triptófano y la digestibilidad de la proteína *in vitro* en el grano de maíz nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo, para conocer el efecto de esta variable en la calidad proteínica del grano procesado.

4.3.4 Determinar la concentración de calcio fijado en el grano total y en diferentes capas del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo, para relacionarlo con las transformaciones en la digestibilidad de la proteína *in vitro* y el contenido de lisina y triptófano.

4.3.5 Evaluar las transformaciones en el grado de gelatinización del almidón y la morfología del endospermo proveniente de granos nixtamalizados, mediante el análisis estratificado de esta estructura, para asociarlas con su contenido de calcio.

4.3.6 Determinar la concentración de lisina y triptófano, en diferentes capas del endospermo del grano nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo, para conocer las modificaciones en el contenido de estos dos aminoácidos presentes en esta estructura.

4.3.7 Determinar la relación entre el contenido de Ca^{2+} y la digestibilidad de la proteína *in vitro* en el grano de maíz nixtamalizado, además de la relación entre la concentración de Ca^{2+} y el contenido de lisina y triptófano en diferentes capas del endospermo del grano de maíz procesado, a fin de establecer el grado de correlación entre estas variables.

Capítulo 2

METODOLOGÍA

5. METODOLOGÍA

5.1 Equipo

- Agitador automático con mallas No. 30, 40, 60, 80 y 100 USA (Ro-Tap, Mod. KH-59986-60)
- Agitador magnético (VELP Scientifica, Mod. NTC-F20310177)
- Analizador de textura (Texture Technologies, Mod. TA-XT2)
- Balanza analítica (AND, Mod. HA-180M)
- Calorímetro (TA Instruments, Mod. Q100)
- Espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, Mod. AAnalyst 300)
- Estufa (Quiney, Mod. 40GC)
- Horno de microondas para digestión de muestras (CEM, Mod. MDS 81D)
- Lavador de gases (BÜCHI, Mod, B-414)
- Microscopio electrónico de barrido de bajo vacío (Noran Instrument, Mod. Voyager 4.2.3)
- Molino de martillos (PULVEX, Mod. 200)
- Molino de piedras (FUMASA, Mod. M100)
- Mufla (Felisa, Mod. FE-360)
- Potenciómetro (Jenco Electronics, LTD, Mod. 6071)
- Sistema de extracción de grasas (BÜCHI, Mod. B-811)
- Sistema extractor de fibra cruda (VELP, Mod. FIWE 6)
- Termobalanza (AND Mod. AD-4713)
- Turbina de baja velocidad para uso odontológico (COA, Mod 2236)
- Unidad de destilación (BÜCHI, Mod, K-370)
- Unidad de digestión kjeldahl (BÜCHI, Mod, K-430)

5.2 Materiales

- Bolsas de filtración para fibra cruda (ANKOM, Mod. F58)
- Cápsulas de porcelana 20 mL (Pyrex)
- Cinta de carbón (Scott)
- Crisoles 10 mL (Pyrex)
- Charolas de acero inoxidable (TA Instruments, No. cat. 900793.901)
- Charolas de aluminio (AND, No. cat. AD-4025)
- Material de cristalería de uso común en el laboratorio (Pyrex)

- Matraces volumétricos de 1000, 500, 100, 50 y 25 mL (Pyrex)
- Micropipetas de 10 mL (PC Scientific, Mod. 10M)
- Pipetas graduadas de 25, 10 y 5 mL (Pyrex)
- Pipetas volumétricas 10 y 5 mL (Pyrex)
- Tubos para digestión de borosilicato (BÜCHI, Mod. 13800010)
- Vasos de teflón (CEM, Mod. PFA-LV)

5.3 Material QPM H-368

El maíz QPM H-368C nativo se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Maíz QPM H-368 desarrollado por el CIMMYT y cultivado en el INIFAP Unidad Bajío.

Este maíz es un híbrido con alta calidad proteínica. Se desarrolló en el CIMMYT y se cultivó en el campo experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Unidad Bajío en Celaya, Guanajuato, México. Esta variedad fue seleccionada considerando tres criterios: 1) Su rendimiento es alto,

equiparado al de otras variedades de maíz comercial, 2) presenta características apropiadas para ser sometido al proceso de nixtamalización de acuerdo a la NMX-FF-034/1-SCFI (2002) y 3) su adaptabilidad a las condiciones climáticas y geográficas del Bajío. La semilla se sembró en el mes de mayo del 2004 y la cosecha se manejó acorde con las recomendaciones del INIFAP. Las mazorcas se cosecharon de manera manual durante el mes de noviembre del 2004, posteriormente, el grano se almacenó a 4 °C hasta su utilización, aproximadamente tres meses después.

La estrategia metodológica para contrastar la hipótesis y el cumplimiento de los objetivos se dividió en tres etapas las cuales se presentan a continuación.

Etapas 1: Caracterización de la materia prima y elaboración de las muestras experimentales

En esta etapa se contempló conocer la composición química y las características del maíz objeto de estudio, como parámetros de referencia para evaluar los cambios morfológicos, microestructurales y las modificaciones en la calidad nutrimental del grano nixtamalizado.

5.4 Caracterización química del maíz nativo

5.4.1 Análisis Químico Proximal

El análisis químico proximal del material a estudiar incluyó la determinación del contenido de humedad y fibra cruda empleando los métodos 925.10 y 920.86 de la AOAC (2000). También se determinó el contenido de cenizas, extracto etéreo y proteína total (% N x 6.25) con los métodos 08-01, 30-25 y 46-13 respectivamente, establecidos por la AACC (2000). Estas determinaciones se realizaron por triplicado, con el fin de conocer la composición química del grano sin procesar, el cual constituye la muestra correspondiente al *grano nativo* o *crudo* (NC).

5.4.2 Contenido de calcio endógeno

La determinación de calcio endógeno es importante para conocer la concentración de calcio en el grano total crudo y en el endospermo, de tal manera que la fijación de calcio residual en el grano total y en el endospermo del maíz nixtamalizado pueda compararse con el calcio endógeno. El contenido de calcio se analizó por

espectrofotometría de absorción atómica (EAA) de acuerdo con el método descrito por Fernández *et al.* (2004) y modificado por Gutiérrez *et al.* (2007).

5.4.2.1 Digestión de las muestras

El análisis se realizó pesando 0.25 g de muestra en vasos de Teflón (CEM, Co. Mod. PFA-LV), a los cuales se les agregaron 10 mL de HNO₃ con alto grado de pureza, se colocaron en un horno de microondas (CEM, Co. Mod. MDS 81D) y se sometieron a una digestión utilizando tres rampas de calentamiento a una potencia de 632 W. En la primera rampa, las muestras se calentaron desde temperatura ambiente hasta 130 °C en 4.5 minutos, la segunda desde 130 hasta 150 °C en 4 minutos y la última desde 150 hasta 175 °C en 4 minutos. Posteriormente, la temperatura se mantuvo constante durante 15 minutos. Después de la digestión, las muestras se filtraron, se les adicionó 1 mL de solución de óxido de lantano (6 % w/v) y se aforaron a 50 mL.

5.4.2.2 Determinación del contenido de calcio por EAA

La concentración de calcio en las muestras se realizó con un equipo de EAA (Perkin Elmer, Mod. AAnalyst 300, USA) de flama utilizando una mezcla de gases (aire-acetileno), equipado con un corrector de respaldo y una lámpara de cátodo hueco de deuterio. Las condiciones de operación del equipo fueron: 12 psi de aire seco, 70 psi de acetileno, una flama a 422.7 nm, lámpara con 10 mA de corriente y con una apertura de 0.7 mm. También se analizó una referencia certificada (*corn meal solid*), para establecer el porcentaje de recuperación. El contenido de calcio se determinó a partir de una curva de calibración elaborada con un estándar con 1000 ppm de calcio.

Las determinaciones se realizaron en el laboratorio de absorción atómica del Instituto de Geografía de la UNAM, el cual está certificado para el análisis de calcio en materiales orgánicos.

5.5 Contenido de aminoácidos esenciales en el maíz nativo por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

El fundamento de esta técnica consiste en la separación basada en la adsorción del analito (aminoácidos) sobre una fase estacionaria no polar, en este caso es una columna de octadecilsilano. En este análisis el orden de elución se predice de acuerdo a

la solubilidad del soluto en la fase móvil, el cual es inverso al orden de elución de la serie elutrópica de Snyder. Por lo anterior, es necesario llevar a cabo el proceso de derivatización de los aminoácidos, que consiste en variar su polaridad al introducir grupos hidrofóbicos en su estructura molecular para disminuir la polaridad del aminoácido, de tal manera que los primeros compuestos en eluir a través de la columna son los de naturaleza más polar, en tanto que los compuestos menos polares presentarán los mayores tiempos de retención durante el análisis (Crabb *et al.*, 1997)

5.5.1 Preparación de las muestras experimentales

Se pesaron 50 g de muestra y se desgrasaron con hexano. Posteriormente se colocaron en una campana de extracción a temperatura ambiente hasta eliminar cualquier residuo de solvente. Posteriormente, se pesó cierta cantidad de muestra desgrasada correspondiente a un contenido de proteína total (% N x 6.25) de 50 mg que se colocó en tubos de cultivo de 10 x 7.5 mm.

5.5.2 Hidrólisis de las muestras

Esta etapa del análisis tiene el propósito de romper los enlaces peptídicos de las proteínas sometiéndolas a una hidrólisis en un medio ácido, con el fin de liberar los aminoácidos que serán cuantificados mediante HPLC. Por lo anterior, las muestras se secaron a vacío (Savant, Inc. USA); también se utilizó un blanco de agua desionizada. A continuación, se colocaron en una cámara que contenía 30 mL de HCl al 30 % (v/v) y 60 µL de fenol y se sellaron a vacío en presencia de hielo durante aproximadamente 2 min y 9 Torr. Posteriormente, las muestras se llevaron a temperatura ambiente y se incubaron en un baño seco durante 24 h a 110 °C. Finalmente, las muestras se secaron a vacío para ser sometidas al proceso de derivatización (Bidlingmeyer *et al.*, 1984).

5.5.3 Derivatización de las muestras

El proceso de derivatización de las muestras tiene como propósito formar derivados de feniltiocarbanoil-aminoácido, mediante la reacción del reactivo fenilisotiocianato (PITC) con el hidrolizado de proteína previamente obtenido, en donde la absorbancia de los derivados eluidos de la columna se mide a una $\lambda = 254$ nm.

A cada una de las muestras se les agregó 20 µL una solución secante constituida por metanol:H₂O:trietanolamina (TEA) (2:2:1), se agitaron vigorosamente en un vórtex (Fischer Scientific, Mod. 02-215-365) durante 1 minuto y se secaron a vacío (2 min/ 9

Torr). A las muestras secas se les añadió 20 µL de una solución de acoplamiento preparada con metanol:H₂O:TEA:PITC (7:1:1:1), se agitaron nuevamente y se taparon. En seguida, se colocaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y se almacenaron a -20 °C. A continuación, a cada una de las muestras se les adicionó una solución de Na₂HPO₄ (5 mM):acetonitrilo:metanol (19:1:5) para su disolución, se agitaron vigorosamente durante 4 minutos y se centrifugaron a 10,000 rpm (Zorvall, Mod. MC12) durante 15 minutos en un cuarto frío. Finalmente, las muestras se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Bidlingmeyer *et al.*, 1984).

5.5.4 Análisis cromatográfico

Las muestras (hidrolizadas y derivatizadas) y una mezcla de aminoácidos estándar se inyectaron en un equipo Waters 2487 (Figura 11).



Figura 11. Equipo HPLC (Waters 2487) para la determinación del contenido de aminoácidos esenciales.

5.5.5 Contenido de triptófano

Hidrólisis de las muestras

La determinación del contenido de triptófano requiere un tratamiento especial de las muestras, ya que este aminoácido se degrada en presencia de aminoácidos tales como la

cistina o de carbohidratos durante una hidrólisis ácida (Ohta y Nakai, 1979); por tal motivo, se llevó a cabo el procedimiento que se describe a continuación.

Las muestras cuya cantidad fuera equivalente a 50 mg de proteína total (% N x 6.25), el patrón de aminoácidos y un blanco de agua desionizada se colocaron en tubos de vidrio y se les agregó una solución de NaOH 4.2 M. Posteriormente, los tubos de vidrio se sellaron y se sometieron a una hidrólisis a 110 °C durante 24 h, se ajustó el pH a 9 agregando una solución de HCl 6 M (Yamashita y Tanoue, 2003). Las muestras se secaron en una centrífuga a vacío (Savant Inc., USA) hasta la eliminación total del líquido sobrenadante. Finalmente, se procedió a realizar la derivatización de las muestras y su análisis mediante HPLC, de la misma manera que para el análisis de aminoácidos esenciales.

5.6 Determinación de la relación endospermo harinoso/endospermo vítreo y dureza en el grano de maíz QPM H-368 nativo

El conocimiento de la relación endospermo harinoso/endospermo vítreo es un parámetro importante para evaluar el tiempo de cocción durante la nixtamalización del grano, ya que se ha reportado que las variedades de maíz QPM requieren de tiempos de cocción más prolongados, debido a que su contenido de endospermo vítreo y dureza es mayor con respecto a las variedades de maíz normal. De la misma manera, la localización de estos dos tipos de endospermo en el grano de maíz, puede estar relacionada con la distribución, el contenido y la composición de la proteína en el cereal.

5.6.1 Contenido de endospermo vítreo y endospermo harinoso

Para la determinación del contenido de endospermo vítreo (córneo) y harinoso (suave) en los granos de maíz objeto de estudio, se utilizó una turbina de baja velocidad para uso odontológico (COA, Internacional, USA) y con una punta de diamante como se muestra en la Figura 12 (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Para tal efecto, el pericarpio y el germen se removieron de manera manual después de remojar 100 granos de maíz con 150 mL de agua destilada durante 3 h con agitación constante (VELP Scientifica Mod. NTC-F20310177). Posteriormente, los granos de maíz se secaron a 40 °C durante 2 h. La relación de endospermo harinoso/vítreo se calculó pesando cada uno de los tipos de endospermo previa remoción del endospermo harinoso.

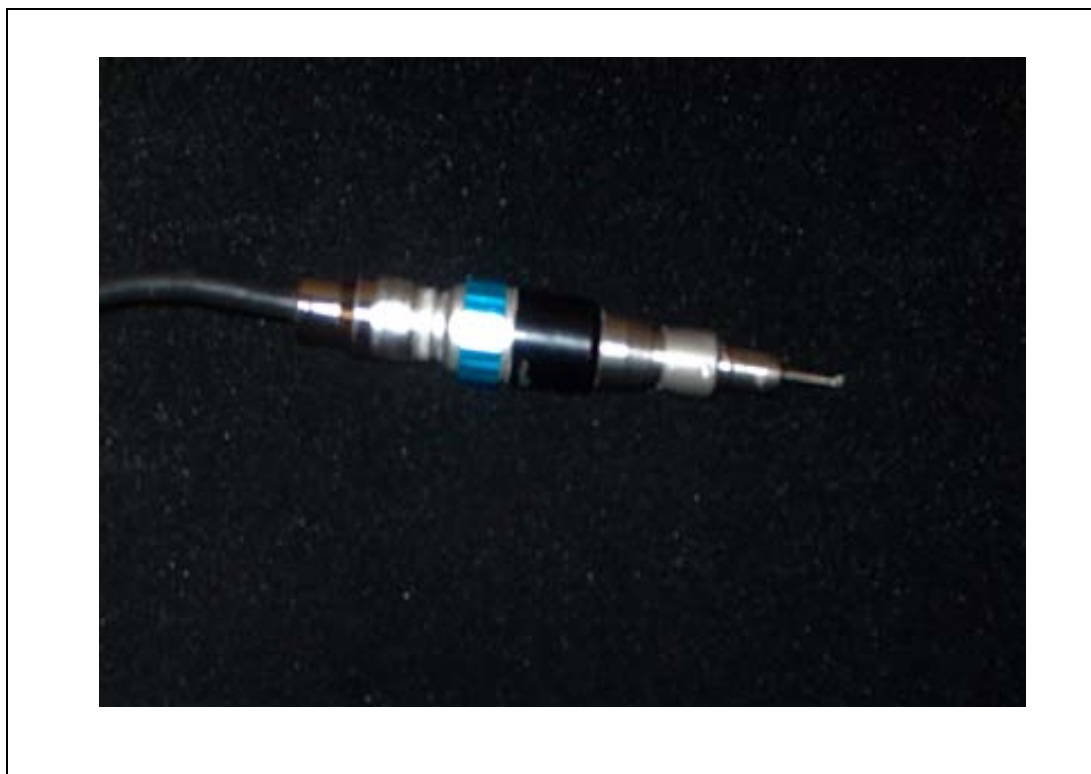


Figura 12. Turbina de baja velocidad con punta de diamante (COA, Internacional, USA).

5.6.2 Dureza del grano

La dureza del grano de maíz y del endospermo se analizó en 100 granos empleando un analizador de textura (Texture Technologies Corp., Mod. TA-XT2 Fairview Road, Scarsdale, N.Y.), en el que se determinó la fuerza de rompimiento requerida para fracturar las muestras. La misma prueba se llevó a cabo para determinar la dureza del endospermo vítreo y del endospermo harinoso. El área bajo la curva que corresponde a la fuerza de deformación empleada para fracturar los granos, se calculó con un software para análisis de textura, mediante el método reportado por Martínez-Bustos *et al.* (1999).

5.7 Análisis de la morfología del endospermo del maíz nativo por microscopía electrónica de barrido a bajo vacío (LV-SEM)

El conocimiento de la morfología del endospermo en el grano nativo es necesario para poderla comparar con la conformación del endospermo del grano nixtamalizado y relacionarla con los datos de calcio fijado o residual en el maíz procesado.

El estudio morfológico del endospermo del grano nativo, se efectuó mediante microscopía electrónica de barrido a bajo vacío (LV-SEM) empleando un microscopio

JSM 5600LV, con una resolución de 5 nm, ajustado con un espectrómetro de rayos X con energía de dispersión (Noran instrument, Mod. Voyager 4.2.3). Previo al análisis, las muestras de maíz se colocaron en un portamuestras de aluminio adheridas con una cinta de carbón. Los análisis se efectuaron con las siguientes condiciones: un voltaje de aceleración electrónica de 20 kV, con una presión en el rango de 12-20 Pa en la cámara de la muestra. Las imágenes se obtuvieron en la superficie a partir de la señal electrónica de barrido.

5.8 Proceso de nixtamalización

5.8.1 Determinación del tiempo de cocción del grano de maíz nixtamalizado por el método tradicional

En esta etapa fue preciso establecer los parámetros cuantitativos para definir el tiempo de cocción del maíz y estandarizar las condiciones experimentales durante el proceso de nixtamalización del grano, debido a que en la literatura científica relacionada con este tema, el criterio que prevalece consiste en la remoción del pericarpio frotando el grano de maíz entre los dedos, siendo ésta una evaluación de tipo cualitativo.

Para la determinación del tiempo de cocción del grano de maíz sometido al tratamiento térmico alcalino, se utilizó un sistema de cocción computarizado con control de temperatura (NCCP) que se muestra en la Figura 13.

Este sistema se desarrolló para poder monitorear la temperatura de las unidades experimentales durante la etapa de cocción y de reposo. El NCCP consiste en un reservorio de cocción aislado, T_1 y T_2 son los termopares empleados para la alimentación y el control de la temperatura del sistema, T_3 y T_4 son los termopares utilizados para monitorear la temperatura del reservorio, los cuales transfieren la información al controlador de temperatura del sistema. Los datos provenientes de T_1 , T_2 , T_3 y T_4 fueron recolectados empleando un puerto RS232 en interfase con una computadora personal posteriormente, los datos de temperatura se graficaron empleando un software en lenguaje BASIC. En el reservorio de cocción se colocaron: una muestra de maíz de 2 kg, 4 litros de agua y 20 g de hidróxido de calcio con un grado de pureza del 95 %. Se programó el sistema de cocción a una temperatura de 92 °C, para iniciar la cocción desde la temperatura ambiente. La muestra se mezcló cada 10 minutos se obtuvieron muestras de 20 g cada 5 minutos durante la etapa de cocción, en donde se analizaron los siguientes parámetros.

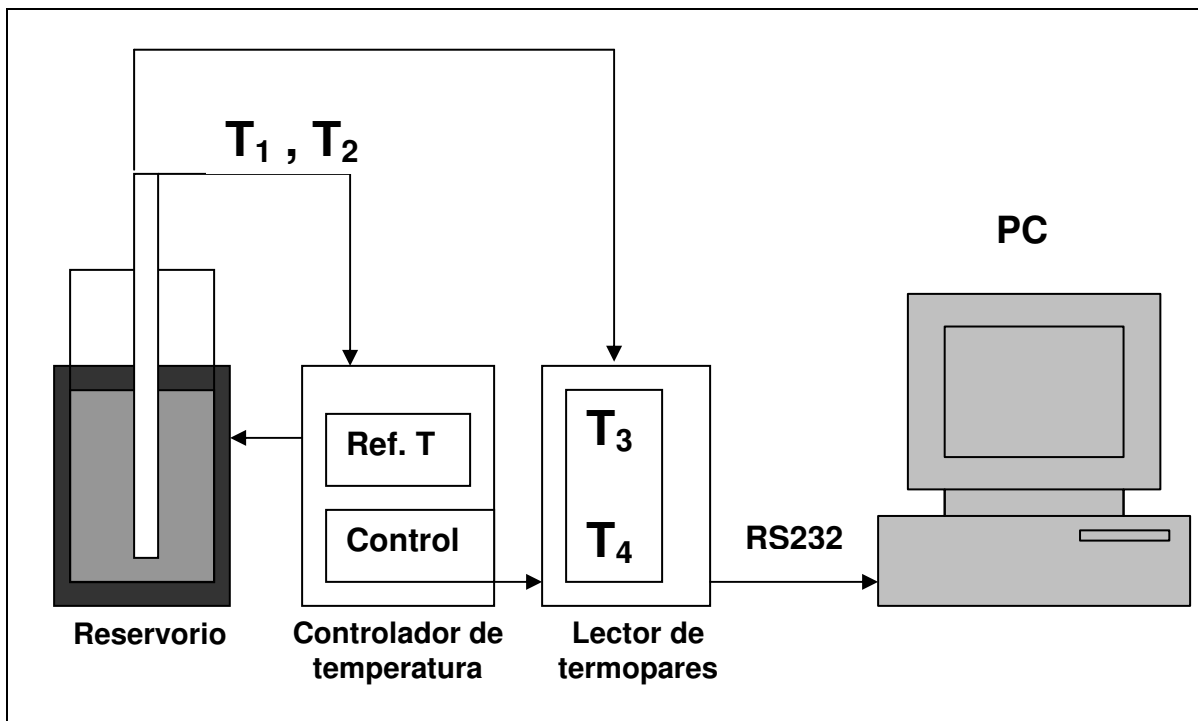


Figura 13. Esquema del sistema de cocción computarizado con control de temperatura (NCCP) (Gutiérrez *et al.*, 2007).

5.8.2 Contenido de humedad

El contenido de humedad del grano durante la etapa de cocción se determinó con los métodos 46-13 (AACC, 2000) y la termobalanza (AND Mod. AD-4713) de manera simultánea. En este último se colocaron 5 g de muestra en la charola de la balanza y se distribuyeron de manera uniforme; se inició el calentamiento con radiación infrarroja hasta alcanzar una temperatura de 108 °C durante 10 min. El contenido de humedad se registró de manera automática por diferencia de pesos. La importancia de este parámetro radica en establecer mediante variables cuantitativas el tiempo de cocción del grano.

5.8.3 pH

Los valores de pH de las muestras se determinaron con un potenciómetro (Jenco Electronics, LTD, Mod. 6071), acorde con el método 44-19 (AACC, 2000). El potenciómetro se calibró a temperatura ambiente con tres soluciones amortiguadoras de referencia (J.T. Baker buffer standard pH 4, pH 7, pH 10). Se colocaron 10 g de muestra en vasos de precipitado de 250 mL, se adicionaron 100 mL de agua tridestilada y se colocaron en una parrilla con agitación durante 15 minutos. Posteriormente, se dejaron

reposar durante 20 minutos. Las lecturas se realizaron en el sobrenadante de cinco muestras independientes y se promediaron.

5.8.4 Contenido de calcio en el pericarpio del grano

El contenido de calcio en el pericarpio del grano de maíz, durante la etapa de cocción, se determinó por EAA. Para realizar esta determinación, se sustrajeron 100 g de granos de maíz del reservorio de cocción y el pericarpio de cada grano se retiró manualmente. La concentración de calcio se analizó por el método de Fernández *et al.* (2004), modificado por Gutiérrez *et al.* (2007) (sección 5.4.2).

El contenido de humedad, calcio en pericarpio y pH se realizaron cada 5 minutos por triplicado, desde el inicio del calentamiento del reservorio de cocción. Todos estos parámetros se correlacionaron con la remoción manual del pericarpio.

5.9 Nixtamalización del grano de maíz

En esta etapa también se elaboraron las muestras de grano de maíz nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo en forma de harinas, en donde para cada una de ellas, se obtuvieron los perfiles térmicos, lo que demuestra el rigor experimental observado durante el proceso de nixtamalización del grano.

El tratamiento térmico alcalino del grano de maíz se llevó a cabo utilizando el NCCP mostrado en la Figura 13, a partir del cual, como ya se mencionó, se obtuvieron los perfiles térmicos de las muestras experimentales durante la etapa de cocción y de reposo. El proceso se realizó con base en el diagrama de bloques mostrado en la Figura 14. Cada muestra se preparó cocinando 3 kg de granos de maíz QPM H-368 limpio y seleccionado por tamaño en una solución de hidróxido de calcio (95 % de pureza, Fermont, Monterrey, NL, México) al 1 % en relación al peso de maíz. La cantidad de solución de Ca(OH)_2 empleada se encuentra en una relación 2:1 (v/w). El maíz se adicionó al reservorio y se calentaron hasta alcanzar una temperatura de 92 °C.

Después de la etapa de cocción, el maíz se puso a reposar durante 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 h. El líquido de cocción o **nejayote** se drenó y se inició con el proceso de lavado de los granos, que consistió en dos lavados consecutivos con agua destilada en una relación 2:1 (v/w), mezclando los granos en el agua de lavado durante 1 minuto. Después del proceso de lavado y drenado, se molieron 2.4 kg de la muestra en un molino

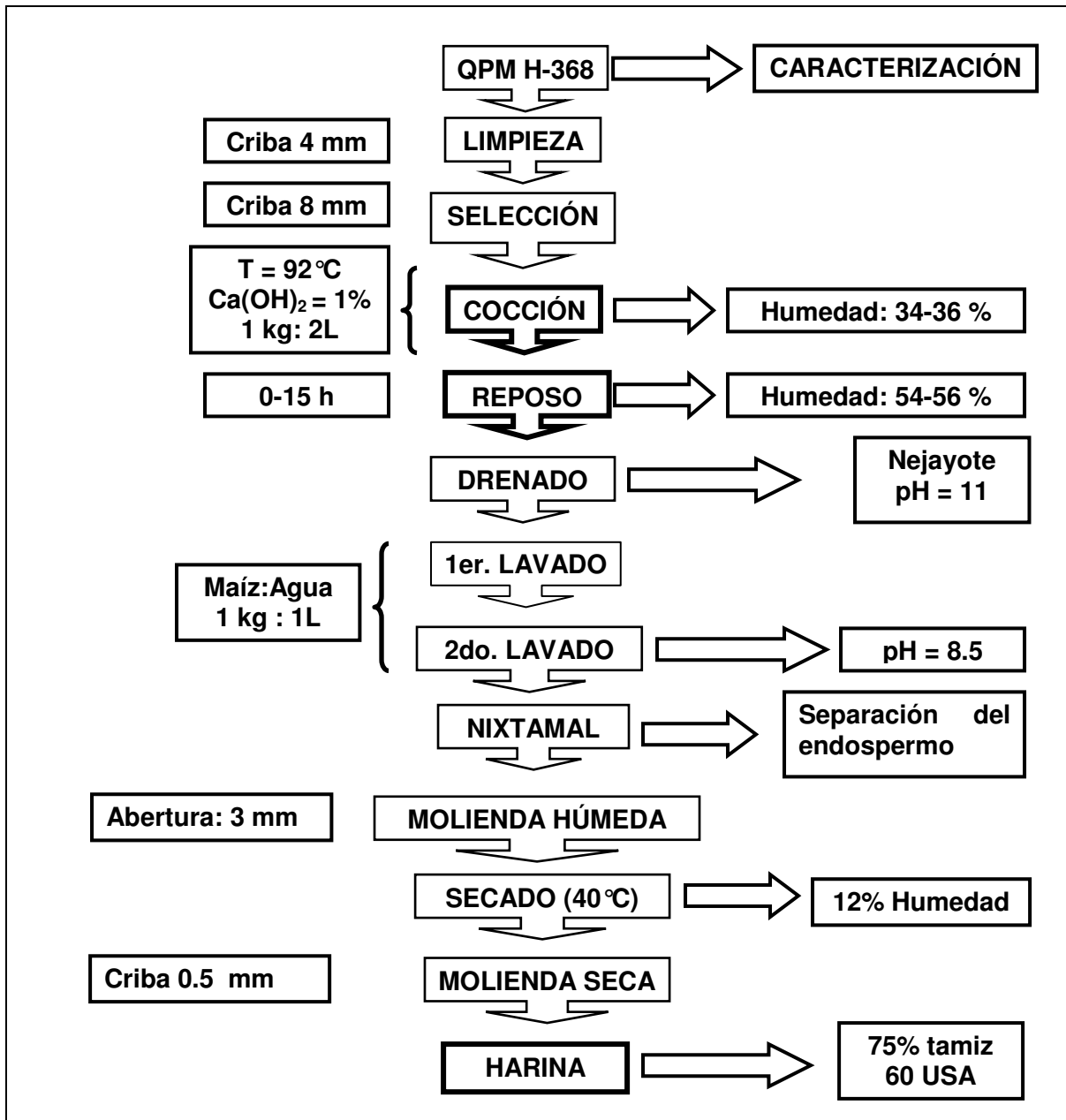


Figura 14. Diagrama de bloques para la elaboración de harinas de maíz nixtamalizado (Gutiérrez *et al.*, 2007).

de piedras (FUMASA, M100, Querétaro, México) hasta obtener un granulado y posteriormente, se deshidrató utilizando un horno de vacío. Las condiciones de secado se ajustaron a una temperatura de 40 °C durante 8 horas. A continuación el material se pulverizó en un molino de martillos (PULVEX 200, México D.F. México) equipado con una malla de 0.8 mm para obtener las **harinas de maíz nixtamalizado** (HMN). También se

elaboró una **muestra control** (CT) a partir de la cocción de los granos de maíz en ausencia Ca(OH)_2 . El contenido de sólidos suspendidos en el nejayote fue de 17 a 20 g/L aproximadamente.

Las HMN y la CT en forma de harina son las unidades experimentales que se utilizaron en la etapa 2 de este trabajo. A los 0.6 kg de los granos lavados remanentes y procedentes de cada muestra, se les separó manualmente el pericarpio, endospermo y germen. El endospermo aislado se secó en un horno con flujo de aire a 40 °C durante 8 h (hasta alcanzar un contenido de humedad del 12 %) para evitar la contaminación microbiana. Los endospermos separados (sin germen) de los granos nixtamalizados y de la muestra control, constituyen las unidades experimentales analizadas en la etapas 3 y 4.

Las capas más externas del endospermo correspondientes al 10 % y al subsiguiente 10 % del peso total del endospermo, se removieron en forma manual, un endospermo a la vez puliendo sus cinco caras con una lija de papel (Fandelli, Sic B-99, 1200 USA), el 80 % remanente pertenece a las capas más internas de esta estructura. Se pulieron un total de 300 endospermos, en donde por diferencia de pesos y empleando una balanza analítica (AND, Mod. HA-180M), se obtuvieron las capas externas de esta estructura. El proceso de lijado se estandarizó de tal manera, que la diferencia de peso entre cada uno de los endospermos no fuera mayor al 1 %.

Etapas 2. Análisis de las modificaciones en las proteínas del maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo

En esta etapa el propósito del análisis es evaluar el efecto del tiempo de reposo en el contenido de proteína, lisina, lisina reactiva y triptófano del grano procesado en forma de harinas de maíz nixtamalizado.

5.10 Contenido de proteína total

El contenido de proteína total (% N x 6.25) del NC, CT y las HMN elaboradas a diferentes tiempos de reposo, se analizaron con el método 46-13 de la AACC (2000).

5.11 Extracción y cuantificación de las proteínas solubles a partir del grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado

En esta etapa también se consideró importante estudiar las modificaciones en la proteína recuperada correspondiente a cada una de las fracciones proteínicas presentes en el grano de maíz y obtenidas a través de su extracción con diferentes soluciones extractantes acorde con el método de Landry-Moureaux (1970), con la finalidad de asociar los cambios en la solubilidad de las proteínas del CT y HMN con su contenido de lisina y triptófano para contrastarlas con los valores obtenidos en el NC.

5.11.1 Extracción de las fracciones proteínicas

La extracción de las proteínas solubles del grano de maíz nativo y nixtamalizado se realizó secuencialmente con el método reportado por Landry *et al.* (2000), como se indica en la Tabla 3.

Previo a la extracción, las muestras en forma de harinas se desgrasaron, colocando 100 mg de muestra en tubos Eppendorf con 1 mL de hexano, los tubos se agitaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, se separó el sobrenadante de las partículas sólidas por centrifugación a 12,000 x *g* durante 5 minutos (Zorvall, Mod. MC12) y las harinas desgrasadas se secaron en una campana de extracción. Posteriormente, se colocaron 100 mg de muestra desgrasada en tubos Eppendorf de 2 mL y se agregó 1 mL de solución extractante en forma consecutiva en el siguiente orden: 1) solución de NaCl 0.5 M a 4 °C, 2) agua a 4 °C (dos veces), 3) solución de 2-propanol (w/w) 55 % + 0.6 % (v/v) 2-mercaptoetanol (2ME) a temperatura ambiente, 4) solución de NaCl 0.5 M, pH 10 + 0.6 % (v/v) 2ME a temperatura ambiente y 5) solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5 % (w/v), pH 10 + 0.6 % 2ME a temperatura ambiente; a la muestra resultante se le denominó residuo. Después de la extracción con la solución de NaCl, las muestras fueron sometidas a dos extracciones sucesivas con agua. El segundo extracto (E₂) se combinó con el extracto en solución salina, dando lugar al extracto E_{1,2}, en tanto que la segunda extracción con agua se descartó. Los sobrenadantes se separaron de las partículas sólidas mediante la centrifugación de las suspensiones a 12,000 x *g* durante 5 minutos, los cuales se combinaron con los extractos correspondientes a cada uno de ellos.

Tabla 3. Fraccionamiento secuencial de las proteínas del maíz QPM H-368

Extracto	Solvente (1 ml)	Tiempo (min)^a
E₁	NaCl 0.5 M, 4 °C	30', 30'
E₂	H ₂ O, 4 °C H ₂ O, 4 °C	15', 15' 15', 15'
E₃	55 % Propanol + TA ^b + ME ^c 0.6 %	30', 30', 15'
E₄	NaCl 0.5 M + ME 0.6 % + TA ^b + pH 10 ^d	15', 15'
E₅	SDS ^e 0.5 % + ME 0.6 % + TA ^b + pH 10 ^c	30', 30', 15'
E₆	Residuo	

E₁ + E₂: Albúminas y globulinas

E₃: α-,β-,δ-, zeína

E₄: γ- zeínas y glutelinas G₁ y G₂

E₅: Glutelinas G₃

E₆: Residuo

^a Tiempo de extracción

^b Temperatura ambiente

^c 2-mercaptoetanol

^d Buffer de borato de sodio (Na₂B₄O₇ · 12 H₂O 0.0125 M y NaOH 0.02 M)

^e Solución de dodecil sulfato de sodio

5.11.2 Cuantificación del contenido de proteína en las fracciones proteínicas

Una vez obtenidas las fracciones proteínicas de cada muestra experimental, se colocó una alícuota de 50 µL de cada extracto en tubos Eppendorf, se les agregaron 750 µL de agua desionizada y 200 µL de reactivo de Bradford (Protein Assay, Bio-Rad, Inc.), de tal manera que el volumen final correspondiente a cada fracción fuera de 1 mL. El reactivo de Bradford se homogenizó hasta alcanzar la temperatura ambiente. Así mismo,

se elaboró una curva de calibración con estándares de proteína preparados mediante la dilución de una proteína estándar, en este caso seroalbúmina de bovino (BSA) a una concentración de 1.14 µg/mL en agua desionizada. En 6 tubos de ensaye se colocaron 0, 0.5, 1, 2, 4 y 8 µg/mL de proteína estándar y se diluyó con 800 µL de agua desionizada, el blanco se preparó únicamente con agua desionizada. En cada tubo se adicionaron 200 µL de reactivo de Bradford. Las muestras se agitaron en un vórtex y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, se colocaron en una celda para medir su absorbancia a una $\lambda = 590$ nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer UV/VIS Lambda Bio). La concentración de proteína total se obtuvo en µg/mL a partir de la curva de calibración. Este análisis se llevó a cabo por triplicado para cada muestra.

5.12 Contenido de lisina y triptófano

Estos dos aminoácidos se analizaron empleando los métodos descritos en la sección 5.5.

5.13 Contenido de Lisina reactiva

En este trabajo se estudió el contenido de lisina reactiva con la finalidad de realizar una evaluación preliminar (screening) y seleccionar los tiempos de reposo, para llevar a cabo la correlación entre el calcio fijado y el contenido de lisina y triptófano en el endospermo del maíz nixtamalizado.

Para la cuantificación de lisina reactiva, se pesó una cantidad de muestra finamente molida, cuyo contenido de lisina, arginina e histidina fuera de 15 mg/100 g N. Las muestras se colocaron en un matraz erlenmeyer con 40 mL de solución 3.89 mM de colorante Orange G (Sigma O-1625), 4 mL de solución saturada de acetato de sodio y se agitaron vigorosamente durante 1 hora. Posteriormente, se colocaron 10 mL de cada muestra en un tubo de ensaye y se centrifugaron durante 10 minutos a 5,000 rpm. Se sustrajo una alícuota de 5 mL de la mezcla y se aforaron hasta un volumen de 100 mL con una solución blanco (KH_2PO_4 0.34 % w/v + ácido oxálico dihidratado 2 % w/v + ácido acético glacial 6 % v/v). La concentración del colorante remanente, es decir, no unido a la lisina se determinó con una curva de calibración elaborada con soluciones estándar de colorante Orange G y a una $\lambda = 475$ nm.

De manera simultánea, en otro grupo de muestras se llevó a cabo el procedimiento descrito en el párrafo anterior, en este caso, adicionando 0.4 mL de anhídrido propiónico

(Merck, Inc.), previo a la incorporación de la solución saturada de acetato de sodio y de la solución colorante de Orange G.

Una vez obtenidas las lecturas correspondientes a ambos grupos de muestras, se aplicó el factor de corrección: $1.1 \times \text{lectura} - 0.915$. A los valores obtenidos en el primer grupo de muestras, se les restaron los correspondientes al segundo grupo para registrar los valores del colorante ligado a la lisina, los cuales son equivalentes al contenido de lisina reactiva o químicamente disponible en la proteína. Estos valores fueron reportados en g/100 g de proteína ($\% N \times 6.25$).

5.14 Contenido de aminoácidos esenciales en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado

En esta etapa también se analizó el contenido de aminoácidos esenciales en el NC, CT y HMN, mediante el procedimiento referido en la sección 5.5, para conocer la modificación en la calificación química del grano procesado por efecto del tiempo de reposo.

5.15 Digestibilidad de la proteína en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado

La digestibilidad de la proteína en el grano de maíz nativo y nixtamalizado se determinó *in vitro*, empleando la metodología propuesta por Hsu *et al.* (1977), donde la proteína se encuentra en suspensión y aplicando la ecuación $Y = 234.84 - 22.56X$, donde Y es la digestibilidad de la proteína *in vitro* (%) y X es el pH de la muestra. Las muestras experimentales se pulverizaron hasta obtener un polvo fino que atravesara una malla del número 80 (serie USA). Se pesó la cantidad suficiente de muestra, a la cual se le adicionaron 10 mL de agua destilada, para que presentara 6.25 mg de proteína/mL. Las muestras se hidrataron por un espacio de una hora a una temperatura de 5 °C. Por otra parte, se ajustó el pH a un valor de 8.0 a 37 °C a una solución enzimática con 1.6 mg de tripsina (Sigma-Aldrich T-0303), 3.1 mg de quimotripsina (Sigma-Aldrich C-4129) y 1.3 mg de peptidasa (Sigma-Aldrich P-7500) por mL de agua destilada. También se ajustaron las muestras a un pH = 8.0 a 37 °C. Posteriormente, a cada una de las muestras se les adicionó 1 mL de la solución multienzimática y la mezcla resultante se agitó durante 10 min en un baño de agua a 37 °C. En seguida, se les agregó 1 mL de una solución de proteasa bacteriana (Sigma-Aldrich P-4630) a una concentración de 7.95 mg/mL y se colocaron en un baño de agua a 55 °C con agitación, durante 9 min. Finalmente, las

muestras se transfirieron a un baño de agua a 37 °C con agitación durante 1 min y se determinó el pH del hidrolizado enzimático. Este análisis se realizó por triplicado para cada muestra.

5.16 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en esta etapa se analizaron empleando un análisis de varianza de una sola vía, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS (Graphics Software System, Manufistics, Inc., USA) y aplicando la prueba de medias de Tukey para detectar diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). El tiempo de reposo fue considerado como el factor de variación.

Etapa 3. Determinación del contenido de calcio residual, evaluación de las transformaciones en el grado de gelatinización del almidón y morfología del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo.

Durante esta etapa se abordó el estudio de las transformaciones en el contenido de calcio en el grano total, así como la concentración de calcio residual, las transiciones de fase de la gelatinización del almidón y morfología en el endospermo del grano nixtamalizado considerándolo como un sistema no-homogéneo, es decir, en forma estratificada o en capas. Esta consideración se asumió bajo la premisa de que el grano de maíz está constituido por diferentes estructuras anatómicas, cada una de ellas con una composición química diferente, en donde la localización y distribución de las proteínas es también distinta, lo que implica que sus interacciones con el calcio serán de igual forma muy diversas. Este enfoque constituye una de las principales aportaciones científicas de este trabajo al estudio de las modificaciones físicas y químicas que experimenta el grano de maíz durante la nixtamalización, ya que hasta este momento, los estudios realizados han considerado al grano como un sistema uniforme.

5.17 Determinación del contenido de calcio residual en el grano total y en el endospermo del grano de maíz

Esta etapa también comprendió la determinación de la concentración de calcio fijado en el grano total, en el endospermo y en las diferentes capas del endospermo del

grano de maíz nativo y nixtamalizado en función del tiempo de reposo, para relacionarlo con su digestibilidad, el contenido de lisina y triptófano.

El contenido de calcio residual en el grano completo, endospermo total, endospermo periférico y endospermo interno correspondientes al primer raspado (10 % w/w), al segundo raspado (10 % w/w) y al 80 % w/w remanente de los granos de maíz nativo y nixtamalizado, se determinó por la técnica de EAA descrita en la sección 5.4.2.

5.18 Grado de gelatinización del almidón en diferentes capas del endospermo por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Es importante recordar que uno de los principales cambios estructurales del almidón está asociado al fenómeno de *gelatinización* y que la técnica de DSC es empleada como un indicador para determinar el grado de gelatinización del almidón de maíz durante el tratamiento térmico alcalino. Por estas razones, se consideró estudiar el grado de gelatinización del almidón del endospermo del grano nixtamalizado en forma estratificada, para relacionarlo con su contenido de calcio residual.

Cada una de las fracciones del endospermo, es decir, el primer raspado correspondiente al 10 % w/w, el segundo raspado (10 % w/w) y el 80 % w/w remanente de los granos de maíz nativo y nixtamalizado con un contenido de humedad de 9.1 %, se analizaron mediante la técnica de DSC, empleando un calorímetro (TA Instruments, Mod. Q1000). Se utilizó un estándar de Indio como referencia. Se pesaron 10 µg de muestra (AND, Mod. HA-180M) en charolas de acero inoxidable (TA Instruments, No. cat. 900793.901), se hidrataron con 55 µL de agua tridestilada y se sellaron herméticamente. Posteriormente, se sometieron a una rampa de calentamiento de 30 a 110 °C a una velocidad de 5 °C/min. El análisis se llevó a cabo en una atmósfera de nitrógeno y con una presión interna máxima de 300 kPa (3 atm). Los valores de entalpía (ΔH) se calcularon empleando un software especializado (TA Instruments, Universal Análisis 2000). Las mediciones se realizaron por triplicado y se reportó el promedio.

5.19 Transformaciones morfológicas del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo por LV-SEM

Este estudio permitió conocer visualmente las transformaciones del endospermo del maíz nativo y nixtamalizado, para evidenciar que los cambios morfológicos que se manifiestan en el endospermo del grano procesado, son el resultado del tratamiento térmico alcalino y en consecuencia, de la difusión de los iones de calcio y agua hacia las

estructuras más internas del grano. Estas evaluaciones también se efectuaron para relacionarlas con el contenido de calcio fijado en el endospermo del grano procesado a diferentes tiempos de reposo y con su calidad proteínica.

El análisis se realizó con el endospermo del grano de maíz una vez separado del pericarpio y del germen en el maíz crudo y procesado, como se indicó en la sección 5.7. Posteriormente, se realizaron cortes longitudinales y transversales en el endospermo, a fin de ser observados a través del microscopio electrónico de barrido a bajo vacío como se señaló en la sección 5.7.

Etapas 4: Evaluación de la relación entre el calcio fijado en el grano total con la digestibilidad de la proteína y la relación entre el contenido de calcio en el endospermo del grano con el contenido de lisina y triptófano

Durante esta etapa, se determinó la relación entre la concentración de calcio y la digestibilidad de la proteína *in vitro* en el grano total nixtamalizado. De la misma manera, se estudiaron de las modificaciones en el contenido de lisina y triptófano del endospermo del maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo en forma estratificada. Adicionalmente, se analizó la concentración de ambos aminoácidos en las capas periféricas e internas del endospermo aislado en el NC, CT y HMN, con la finalidad de correlacionar el contenido de estos dos aminoácidos con el calcio residual presente en las diferentes capas del endospermo.

5.20 Contenido de proteína en diferentes capas del endospermo del maíz nixtamalizado

Se analizó el contenido de proteína en las capas periféricas e internas del endospermo del maíz, ya que se ha observado que el endospermo vítreo, presenta un mayor contenido de proteína con respecto al endospermo harinoso. En el caso del maíz objeto de estudio, el contenido de proteína en el endospermo podría estar asociado con la distribución de las proteínas en esta estructura y con su contenido de aminoácidos. Esta determinación se realizó conforme a la sección 5.10.

5.21 Contenido de lisina y triptófano en diferentes capas del endospermo del maíz nixtamalizado

Cada una de las estructuras anatómicas del grano de maíz presenta un perfil de aminoácidos diferente, por lo tanto, se planteó la posibilidad de que el contenido de lisina y triptófano se puede modificar en función del tipo de endospermo y de las proteínas presentes en cada una de sus capas. La concentración de lisina y triptófano se efectuó acorde con la sección 5.5.

5.22 Correlación entre el calcio fijado en el grano total con la digestibilidad de la proteína y correlación entre el contenido de calcio en el endospermo del grano con el contenido de lisina y triptófano

La relación entre el contenido de calcio y la digestibilidad de la proteína en el grano completo, así como la relación entre el calcio fijado en el endospermo del grano de maíz y el contenido de lisina y triptófano, se realizó empleando los datos para la digestibilidad *in vitro* de la proteína y la concentración de calcio en el grano total, además del contenido de lisina, triptófano y calcio residual en el endospermo total y en cada una de sus capas, los cuales fueron sometidos a un análisis de correlación simple, (STATGRAPHICS, Graphics Software System, Manufistics, Inc., USA) utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (Daniel, 1998).

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la presente disertación se dividen en cuatro secciones. En la primera sección se presentan los resultados de los objetivos particulares 1 y 2, correspondientes a la caracterización de la materia prima, así como al perfil térmico de las muestras experimentales en forma de gráficos de temperatura vs tiempo. Estos gráficos se obtuvieron a partir del empleo de un NCCP para controlar la temperatura, asegurando de esta manera que el tratamiento térmico alcalino fuera el mismo en todas las muestras experimentales. De igual forma se presentan los parámetros cuantitativos que definieron el tiempo de cocción del grano.

La segunda sección comprende los resultados del análisis de las modificaciones en la digestibilidad y el contenido de lisina, lisina reactiva y triptófano del grano de maíz nixtamalizado en forma de harina en función del tiempo de reposo planteado en el objetivo particular 3.

La tercera sección corresponde a la determinación del contenido de calcio y a la evaluación de las transformaciones en el grado de gelatinización del almidón y la morfología del endospermo periférico e interno del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo (objetivos particulares 4 y 5), donde se muestran gráficos, termogramas e imágenes obtenidas mediante DSC y LV-SEM.

Finalmente, en la cuarta sección se muestran los resultados de la evaluación del contenido de proteína, lisina total y triptófano en las capas externas e internas del endospermo del grano nixtamalizado, así como la relación entre la concentración de estos dos aminoácidos y la digestibilidad con el calcio fijado en el grano (objetivos particulares 6 y 7).

6.1 Resultados de los objetivos particulares 1 y 2

6.1.1 Análisis del grano de maíz QPM H-368 nativo

El análisis químico proximal del grano de maíz se muestra en la Tabla 4.

El contenido de humedad del grano almacenado fue de 12.1 %, este valor es inferior al límite establecido por la NMX-FF-034/1-SCFI-2002 que es del 15 %, el cual puede estar influenciado por el tipo de grano, ya que los maíces de tipo cristalino y semicristalino tienden a tener un menor contenido de humedad (Méndez *et al.*, 2005). Este parámetro es un indicador de las condiciones de almacenamiento del grano, ya que

si es mayor a lo indicado por la norma, pueden producirse pérdidas importantes por contaminación de hongos (Watson, 1987a).

El contenido de lípidos (5.12 %) se observó dentro del rango reportado por Méndez *et al.* (2005) para variedades de maíz con calidad proteínica (4 a 7 %); esta característica depende de la variedad y de las condiciones en las que se manejan los lotes de producción.

El contenido de cenizas fue similar al promedio observado para variedades cultivadas en regiones tropicales (1.41 %).

El contenido de fibra cruda resultó de 11.3 %, este valor es mayor con respecto a los valores reportados por Bressani *et al.* (1958) y Trejo-Gonzalez *et al.* (1982). Estos autores señalan un valor promedio de fibra cruda para variedades de maíz normal de 1.46 y 2.3 %, respectivamente. Sin embargo, cabe destacar que el contenido de fibra cruda en el grano objeto de estudio, se encuentra en el rango de 7.1 y 13.1 % observado por Méndez *et al.* (2005) para el contenido de fibra dietética en híbridos y variedades de maíz normal y QPM.

El contenido de extracto libre de nitrógeno (62.64 %) se encuentra por debajo de los valores reportados por Paredes y Saharopulos (1983) y Méndez *et al.* (2005), quienes mencionan valores de 72 y 75 %, respectivamente.

El contenido de proteína fue de 7.5 %; este valor se encuentra en el rango de 6.0 a 12.0 % reportado por Paredes *et al.* (2000) para híbridos cultivados en diferentes localidades del país. Se ha observado que el tipo de grano influye más en el contenido total de proteína que la característica QPM, aunque algunos materiales con endospermo harinoso tienen un alto contenido de proteína; por tanto, la constitución genética de la variedad de maíz tiene mayor relevancia sobre este componente (Armstrong *et al.*, 2000).

Tabla 4. Análisis químico proximal del maíz QPM H-368 nativo (g/ 100 g de muestra).

Humedad [†]	Proteína [†]	Cenizas [†]	Grasa [†]	Fibra [†]	Carbohidratos ¹
12.1 ± 0.29	7.5 ± 0.18	1.41 ± 0.10	5.12 ± 0.10	11.3 ± 0.5	62.64

[†] $\mu \pm DS$ (n = 5)

¹ Obtenido por diferencia

6.1.2 Contenido de lisina y triptófano (g/100 g proteína) en el maíz nativo analizado por HPLC

El contenido de lisina y triptófano en el grano nativo resultó de 4.37 % y 1.14 %, respectivamente. Estos valores son mayores al valor promedio reportado para lisina en variedades de maíz normal cultivadas en la región del altiplano (1.58 %) y planicie (1.66 %) de Centroamérica, así como al contenido de triptófano presente en estas mismas variedades de maíz que fue de 0.32 y 0.43 %, respectivamente (Bressani *et al.*, 1990). Con relación a este punto, Watson (1987b; 2003) señala que en los maíces QPM, el incremento en la calidad de la proteína está relacionado con los aminoácidos esenciales lisina y triptófano, más que con el contenido de proteína.

6.1.3 Contenido de endospermo vítreo, endospermo harinoso y dureza en el maíz

En la Figura 15 se muestra el endospermo del maíz QPM H-368. Como se puede observar, el endospermo harinoso se localiza en la parte superior del grano y en la parte posterior del germen, desde la cofia hasta la corona, el cual se encuentra recubierto por el endospermo córneo o vítreo, por lo tanto, este último se encuentra en la periferia del grano. Los orificios en el grano muestran la localización del endospermo harinoso y del germen una vez removidos del grano.

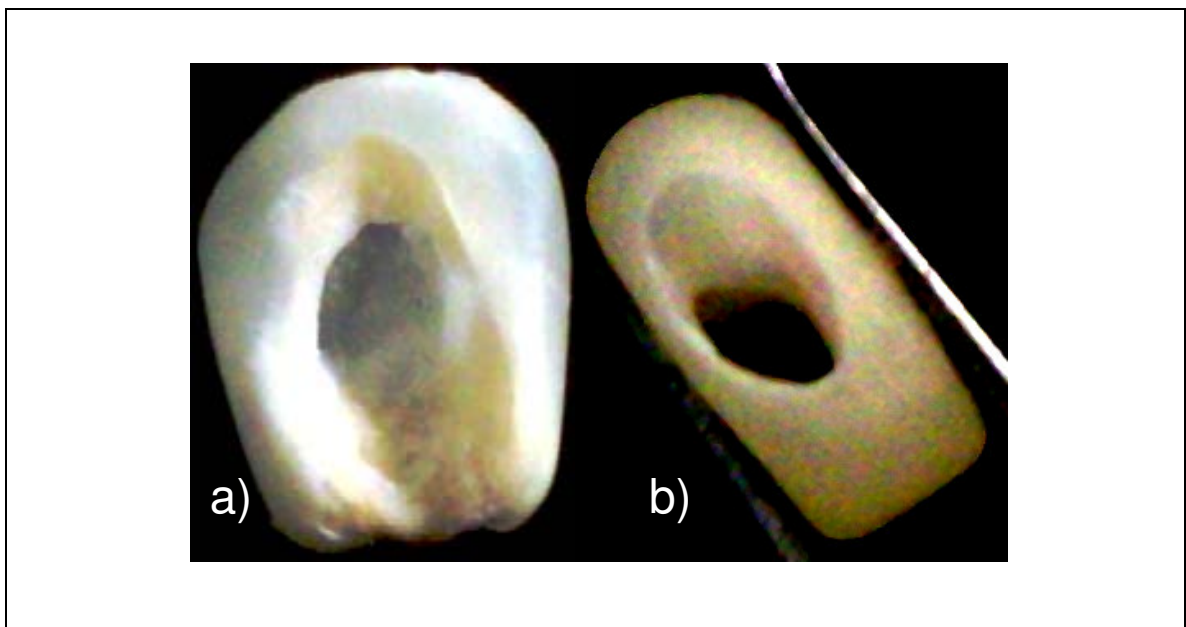


Figura 15. a) Vista frontal del endospermo del maíz QPM H-368 nativo. b) Vista superior del grano (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

Con respecto a la dureza, se obtuvieron los siguientes resultados: para el grano nativo resultó de 14.82 ± 1.34 kgf; en tanto que para el endospermo vítreo y harinoso fue de 12.33 ± 1.11 y 7.99 ± 1.24 kgf, respectivamente.

En el grano de maíz QPM H-368 el porcentaje de endospermo vítreo fue de 79.18 % y el remanente corresponde al endospermo harinoso, es decir, la relación de endospermo vítreo/endospermo harinoso es de 4:1. El contenido de proteína en el endospermo vítreo (12.04 ± 0.3 %) fue mayor comparado con el endospermo suave (3.17 ± 0.1 %). Estos resultados están acorde con lo señalado por Paiva *et al.* (1991) y Shandera y Jackson (2002), quienes mencionan que el endospermo vítreo presenta un mayor contenido de proteína con respecto al endospermo harinoso, aunado al hecho de que la matriz proteínica que recubre a los gránulos se torna más gruesa desde la fisura central del grano (germen) hacia la parte externa (Watson, 2003). Este aspecto es de gran relevancia desde el punto de vista nutricional, ya que las propiedades vítreas del endospermo, puedan estar correlacionadas con el contenido y composición de la proteína (Christianson *et al.*, 1969).

6.1.4 Análisis microestructural del endospermo del maíz nativo por LV-SEM

En la Figura 16 se muestran micrografías del endospermo del maíz objeto de estudio obtenidas por LV-SEM.

En estas imágenes se evidencia que los gránulos de almidón del endospermo vítreo adquieren una geometría poliédrica (16a y 16b), en tanto que los gránulos del endospermo harinoso son esféricos (16c y 16d). En ambos tipos de endospermo, estos gránulos se encuentran empacados aleatoriamente en el interior de los paquetes de almidón, los cuales a su vez, se encuentran comprimidos y encapsulados por la matriz proteínica.

Watson (2003) señala que en el endospermo vítreo, la matriz proteínica que recubre a los gránulos de almidón es más gruesa y resistente que la matriz que recubre a los gránulos del endospermo harinoso. En el primero los gránulos de almidón están más comprimidos, no presentan cavidades aéreas y son de aspecto traslúcido, a diferencia del endospermo harinoso, en donde estos espacios aéreas no permiten la transmisión de la luz y le confieren una apariencia opaca. En el proceso de nixtamalización, la ausencia de estas cavidades puede influir en la difusión de agua y calcio hacia el interior del grano, es

decir, una mayor compresión de los gránulos de almidón en el endospermo vítreo, puede impedir o retrasar la difusión de agua y calcio hacia el endospermo harinoso del grano.

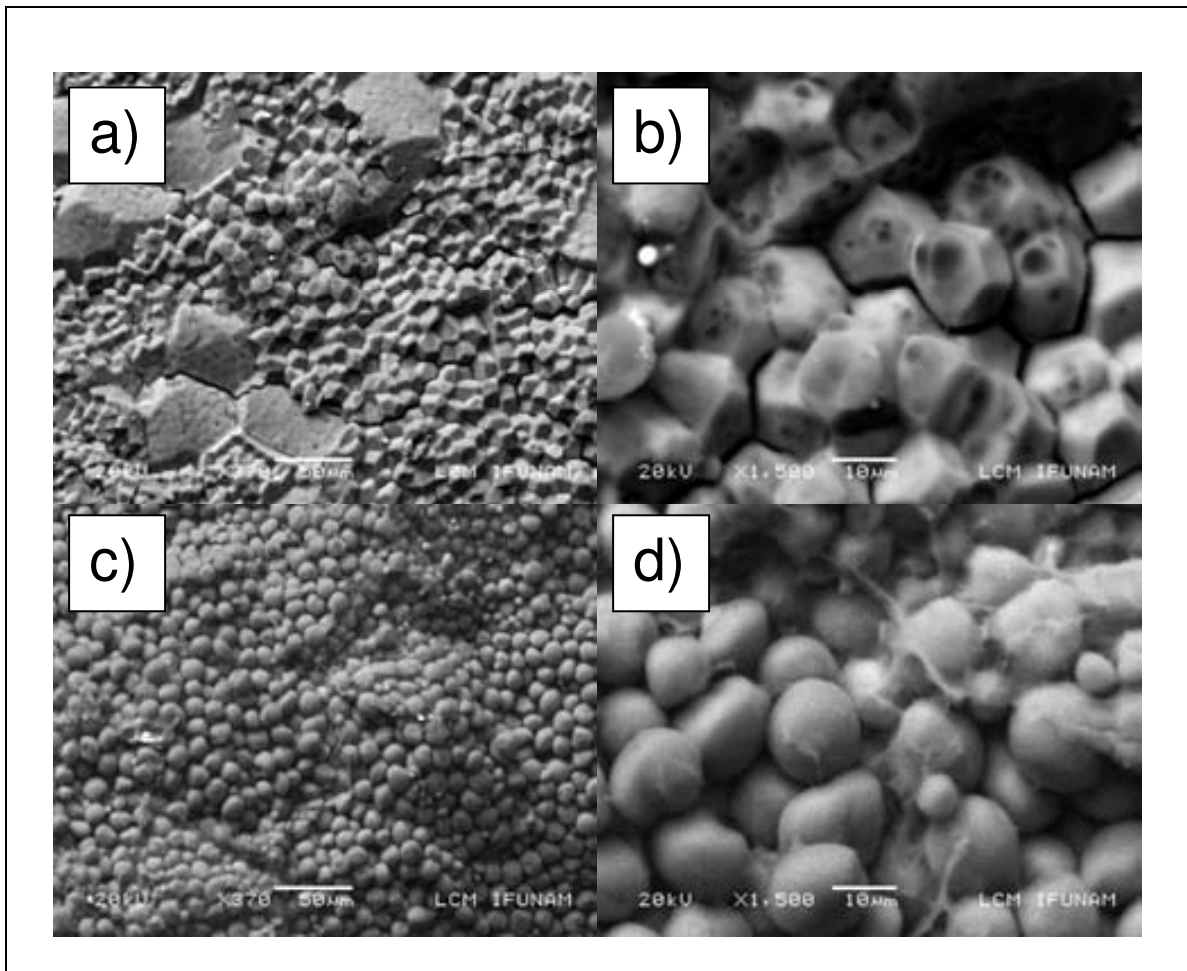


Figura 16. Micrografías obtenidas mediante LV-SEM del maíz QPM H-368 nativo: a) y b) Endospermo vítreo, c) y d) Endospermo harinoso (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

6.1.5 Establecimiento de los parámetros cuantitativos para definir el tiempo de cocción del grano durante el proceso de nixtamalización

En las Figuras 17 y 18, se muestran con las líneas punteadas el contenido de humedad en el grano (35.45 ± 1.43 %) y la concentración de calcio en el pericarpio (2.3 ± 0.13 %), que permitieron definir el tiempo de cocción del grano. Ambos valores correlacionaron con el desprendimiento del pericarpio en forma manual.

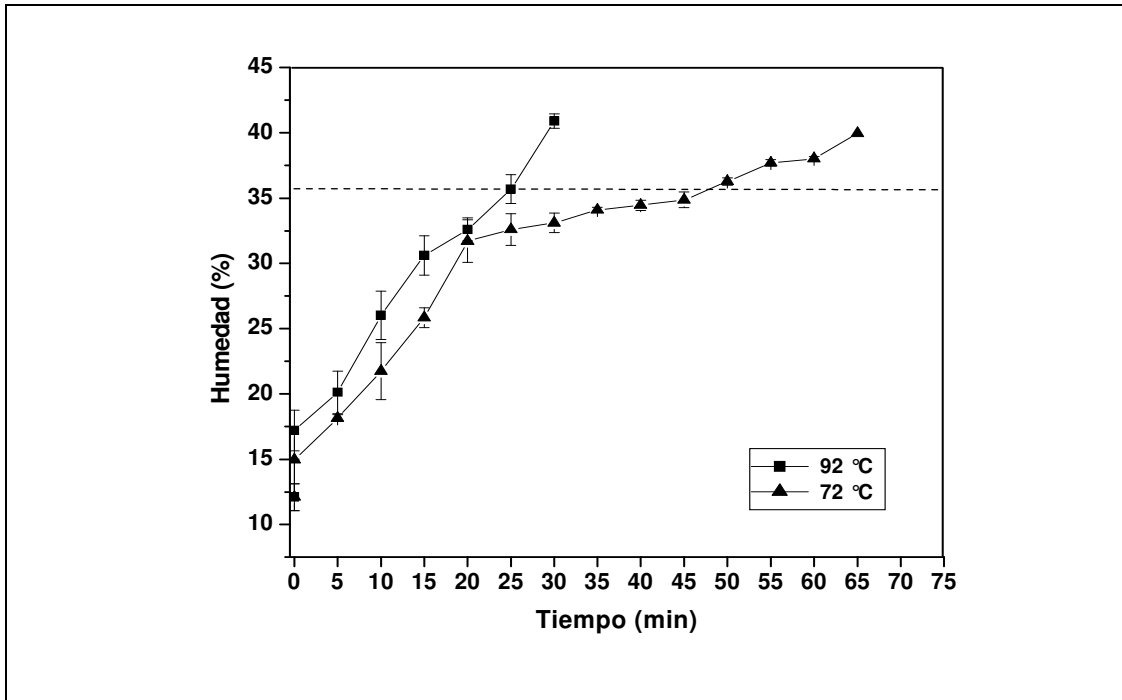


Figura 17. Contenido de humedad en el grano de maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 1 % (w/v) durante la etapa de cocción (Gutiérrez *et al.*, 2007).

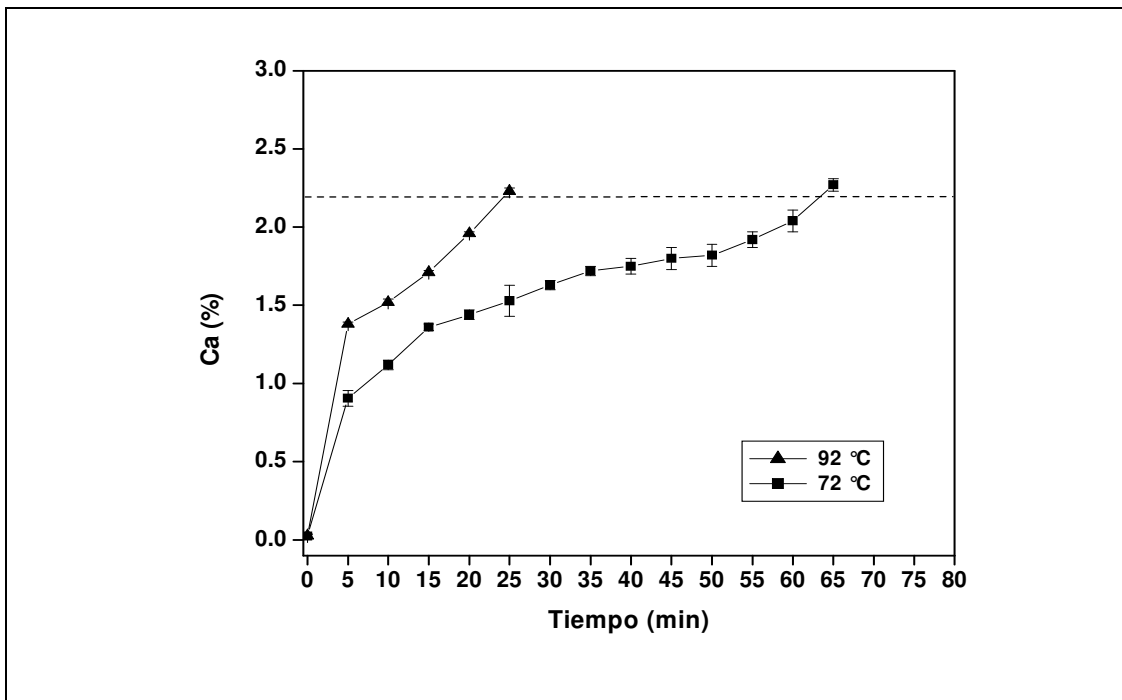


Figura 18. Contenido de calcio en el pericarpio del grano de maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 1 % (w/v) durante la etapa de cocción.

Con respecto a las determinaciones de pH, no se detectó un valor puntual que estuviera correlacionado con la remoción manual del pericarpio. Hasta el momento los trabajos relacionados con el proceso de nixtamalización, consideran que la etapa de cocción finaliza cuando el pericarpio se desprende al frotar el grano entre los dedos. Estos resultados permiten reportar por primera vez en la literatura científica, el tiempo requerido para la etapa de cocción del maíz en función de parámetros cuantitativos (Gutiérrez *et al.*, 2007). Es importante mencionar que en muestras nixtamalizadas a 72 °C, los valores de humedad y contenido de calcio en el pericarpio para definir el tiempo de cocción fueron muy similares a los observados a 92 °C, estableciéndose un tiempo de cocción de 25 y 65 min para la temperatura de 92 y 72 °C, respectivamente.

6.1.6 Perfiles térmicos del grano de maíz sometido al tratamiento térmico alcalino

En la Figura 19 se muestran los perfiles térmicos de las unidades experimentales,

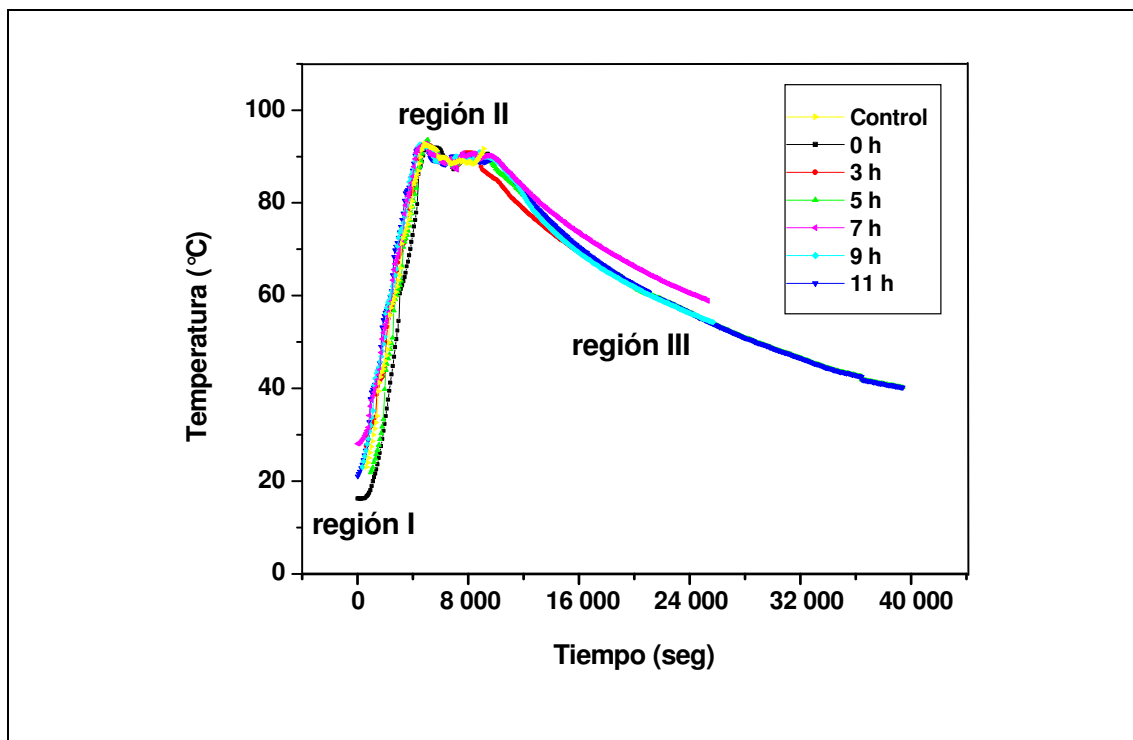


Figura 19. Perfiles térmicos del grano de maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 1 % (w/v) a diferentes tiempos de reposo (Gutiérrez *et al.*, 2007).

del grano de maíz sometido al tratamiento térmico alcalino a 92 °C durante 25 minutos a diferentes tiempos de reposo (0, 3, 5, 7, 9 y 11 h), así como de la muestra control.

En la Figura 19 la región I corresponde al periodo de calentamiento de las muestras hasta que se alcanzó una temperatura de 92 °C. La región II pertenece a la etapa de cocción, en donde se puede apreciar que la temperatura del sistema permaneció constante hasta que la humedad de las muestras y el contenido de calcio en el pericarpio alcanzaron los valores señalados en la sección anterior. Posteriormente, se suspendió el calentamiento del sistema y los granos de maíz permanecieron en el líquido de cocción (desde 0 hasta 15 h), la cual corresponde a la etapa de reposo (región III). Estas gráficas demuestran el control y la rigidez experimental con el que se obtuvieron las unidades experimentales.

6.2 Resultados del objetivo particular 3

6.2.1 Contenido de proteína total en el grano de maíz QPM H-368 nativo y HMN en función del tiempo de reposo

El contenido de proteína total del grano procesado en forma de HMN se modificó en función del tiempo de reposo como se muestra en la Figura 20.

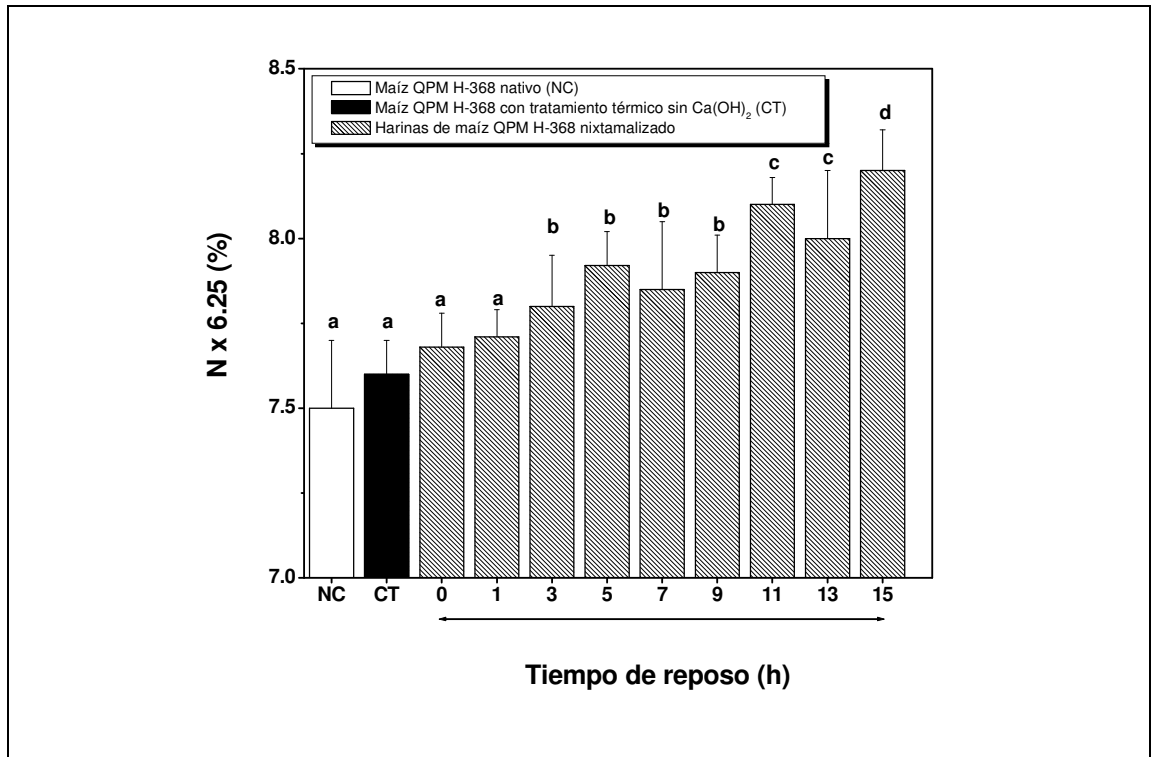


Figura 20. Contenido de proteína (% N x 6.25) en el maíz QPM H-368 nativo, muestra control y harinas de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina *et al.*, 2008). Las barras con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0.05$) entre sí.

El contenido de este componente fue en promedio de 7.6 % \pm 0.54 en la muestra control y de 7.92 % \pm 0.21 en las HMN. En ambos casos fue mayor al valor obtenido para el grano nativo (7.5 % \pm 0.25). Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grano nativo y las HMN, con excepción de las muestras obtenidas a 0 y 1 hora de reposo, así como en la muestra control. El contenido de proteína en las HMN fue similar al intervalo (6.68 a 9 %) reportado por Bressani *et al.* (2001) y Bello *et al.* (2002) y menor al valor promedio (9.72 % \pm 0.54) observado por Flores *et al.* (2000) para harinas

instantáneas de maíz nixtamalizado comerciales. Estas diferencias podrían atribuirse a que las variedades de maíz QPM presentan una menor pérdida de materia seca, debido a que el pericarpio no es removido completamente durante la etapa de cocción y de reposo del proceso de nixtamalización (Serna *et al.*, 1992). Es importante señalar que hubo una correlación estadísticamente significativa ($p \leq 0.01$) entre el contenido de proteína y el tiempo de reposo ($r = 0.73$). El incremento en el contenido de proteína en el maíz nixtamalizado, se ha relacionado con el aumento de su concentración, a causa de la pérdida de lípidos y fibra a través del *nejayote* o licor de cocción. El incremento en la concentración de proteína, resulta de las transformaciones químicas y morfológicas que experimentan el germen y el pericarpio durante la nixtamalización. Esto ocasiona la remoción de ambas estructuras anatómicas, para formar parte de la materia seca perdida durante la etapa de reposo y lavado del proceso (Ortega *et al.*, 1986; Almeida *et al.*, 1998).

6.2.2 Perfil de la proteína recuperada en las fracciones proteínicas extraídas a partir del grano de maíz nativo, control y HMN en función del tiempo de reposo

La Figura 21 muestra el contenido de proteína en las fracciones proteínicas extraídas a partir del grano nativo (NC), de la muestra control (CT) y de las harinas de maíz nixtamalizado (HMN) en función del tiempo de reposo. En esta figura se puede observar, que en todas las muestras el contenido de proteína recuperada fue mayor al 90 %.

La proteína recuperada en la fracción de albúminas y globulinas disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) en la muestra control y en las HMN con respecto al grano nativo. Estos resultados están de acuerdo con Trejo-González *et al.* (1982), Sproule *et al.* (1988), Ortega *et al.* (1986) y Vivas *et al.* (1992), quienes reportaron que durante el proceso de nixtamalización, esta fracción proteínica se reduce tanto en variedades de maíz normal como QPM. Estos investigadores mencionan que la disminución en el contenido de proteína en la fracción de albúminas + globulinas, es debido a la pérdida de compuestos de nitrógeno, como por ejemplo, aminoácidos libres los cuales se encuentran en mayor concentración en las variedades de maíz QPM y se determinan en esta fracción (Mertz *et al.*, 1964). No obstante la reducción en el contenido de proteína recuperada en esta fracción en las HMN, estos valores son mayores a los reportados por Sproule *et al.*, (1988) y Vivas *et al.* (1990), para el contenido de proteína en esta fracción extraída a partir de tortillas y totopos de maíz normal.

En la fracción correspondiente a las α -, β -, δ - zeínas, se observó que el contenido de proteína recuperada en la CT se incrementó, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con el NC. Así mismo, se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el NC y las HMN elaboradas a tiempos de reposo prolongados (11,13 y 15 h), en donde el contenido de proteína recuperada disminuyó. Ortega *et al.* (1986) señalan que la fracción de prolaminas (α -, β -, δ - zeínas) disminuye su solubilidad en los solventes de extracción, como resultado de la formación de enlaces cruzados entre las proteínas a través de enlaces disulfuro, los cuales se favorecen por efecto del tratamiento térmico alcalino.

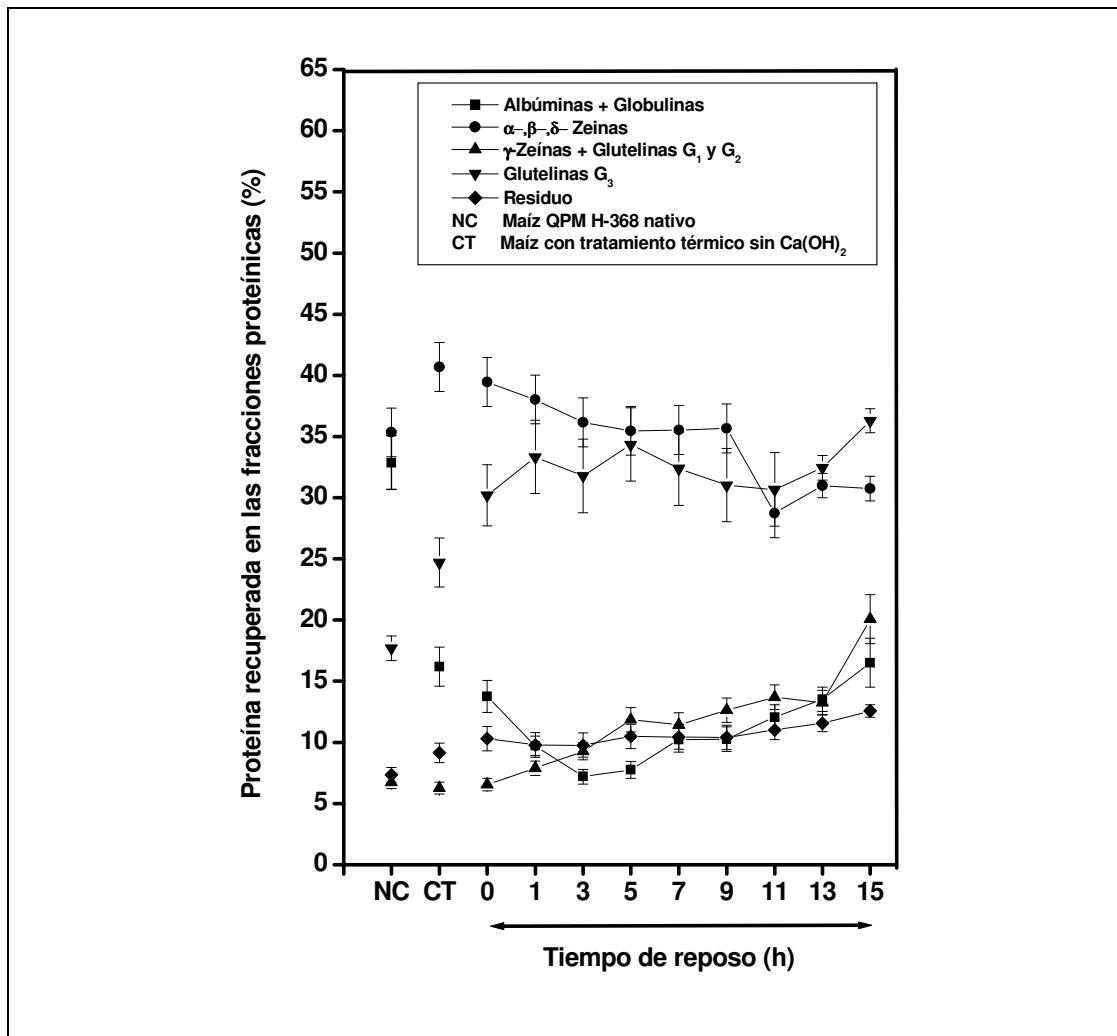


Figura 21. Contenido de proteína en las fracciones proteínicas extraídas a partir del grano nativo, muestra control y HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina *et al.*, 2008).

Resulta interesante mencionar que entre las 3 y 5 h de reposo, se observaron los valores mínimos en el contenido de proteína en la fracción de albúminas + globulinas, a su vez, a estas mismas horas de reposo, el contenido de α -, β -, δ - zeínas no se modificó comparado con el grano nativo. Este punto adquiere importancia desde el punto de vista nutricional, ya que la contribución de lisina y triptófano por parte de la fracción de albúminas + globulinas en la proteína total del grano de maíz es altamente significativa, en tanto que las α -, β -, δ - zeínas son deficientes en ambos aminoácidos (Lawton y Wilson, 2003).

El contenido de proteína en la fracción de las γ -zeínas + glutelinas G_1 y G_2 aumentó en las HMN (tiempo mayor a 1 h); sin embargo, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) con el grano nativo en los tiempos de reposo prolongados (desde 7 hasta 15 h). Este incremento podría atribuirse a la adición de algunas prolaminas a esta fracción que han formado enlaces cruzados entre sí, mediante puentes disulfuro durante el tratamiento térmico alcalino a la que fueron sometidas. Si este fuera el caso, las proteínas se solubilizarán en presencia de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol.

En la fracción de las glutelinas G_3 y en el residuo, se observó un incremento significativo ($p \leq 0.05$) en la cantidad de proteína contenida en la muestra control y en las HMN con respecto al grano crudo. Con relación al incremento en la proteína recuperada en esta fracción y en el residuo, Ortega *et al.* (1986) y Vivas *et al.* (1987) reportaron que la proteína no recuperada en las fracciones de albúminas, globulinas y zeínas, forma agregados moleculares que se adicionan a la fracción de glutelinas y el residuo. Con relación a este tema, Sanderson *et al.* (1978) y Paredes *et al.* (1982) señalan que probablemente las interacciones hidrofóbicas, la desnaturalización de las proteínas, la formación de enlaces cruzados entre las proteínas y de residuos de aminoácidos como la lisinoalanina son los responsables de las modificaciones en la solubilidad de las proteínas durante el proceso de nixtamalización.

6.2.3 Contenido de lisina total y lisina reactiva en el grano de maíz QPM H-368 nativo y HMN en función del tiempo de reposo

La Figura 22 muestra el contenido de lisina total y lisina reactiva en la caseína o proteína patrón (CA), en el grano nativo o crudo (NC), en el control (CT) y en las harinas de maíz nixtamalizado (HMN) en función del tiempo de reposo.

En la Figura 22 se demuestra que el contenido de lisina total en la CT y en las HMN se reduce significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto al NC. Sin embargo, esta disminución no es proporcional al tiempo de reposo. A las 5 h se detectó una reducción del 36 % de este aminoácido con respecto al grano nativo. La disminución en el contenido de lisina podría estar asociada con la reducción en el contenido de la proteína total recuperada en la fracción de albúminas + globulinas que muestra la Figura 21. Esto es debido a que la contribución de lisina y triptófano de esta fracción a la proteína del maíz es altamente significativa (White y Johnson, 2003). Adicionalmente, la correlación entre el contenido total de lisina y la proteína recuperada en la fracción de albúminas + globulinas fue de $r = 0.76$. De la misma manera, a estas horas de reposo, los niveles en el contenido de proteína recuperada en la fracción de las α -, β -, δ - zeínas, no se modificó con respecto al NC, en tanto que en la fracción de las γ -zeínas + glutelinas G_1 y G_2 se observaron niveles elevados. Ambas fracciones se caracterizan por su bajo contenido en lisina y triptófano, no obstante, contienen metionina y leucina (Abe *et al.*, 1981; Swarup *et al.*, 1995; Yau *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que el contenido de lisina total es el resultado de la distribución en las proteínas recuperadas en el grano de maíz nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo.

Así mismo, la disminución de lisina total en las HMN puede atribuirse a las transformaciones físicas y químicas que tienen lugar en cada una de las estructuras anatómicas del grano de maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino. A este respecto, Gutiérrez *et al.* (2007) observaron a través de imágenes obtenidas por LV-SEM, que el pericarpio se desprende del grano de maíz cocido y reposado durante 5 h, dejando al descubierto las capas más externas del endospermo, en donde se localiza la capa de aleurona cuyo contenido de aminoácidos esenciales es importante. La pérdida del pericarpio expone esta estructura al contacto directo con la solución alcalina y a la pérdida de sus aminoácidos a través del líquido de cocción o *nejayote*.

Es importante mencionar, que aún cuando se detectó una reducción en el contenido de lisina total en las HMN, los valores observados corroboran que el contenido de este aminoácido es superior al encontrado en tortillas elaboradas con maíz normal reportados por Ortega *et al.* (1986) y Sproule *et al.* (1988). Estos autores mencionan concentraciones de 2.5 y 2.8 g lisina total/100 g proteína para tiempos de reposo de 16 y 12 h respectivamente.

El contenido de lisina reactiva, se modificó en función del tiempo de reposo. Este parámetro se incrementó en las HMN obtenidas a las 0, 1, 3, 9, 11 y 15 h, (desde un 7.3

hasta un 60 %) con respecto al NC de manera significativa ($p \leq 0.05$). Por el contrario, en las HMN correspondientes a las 5 y 7 h, disminuyó significativamente ($p \leq 0.05$) comparadas con el NC (ver Figura 22).

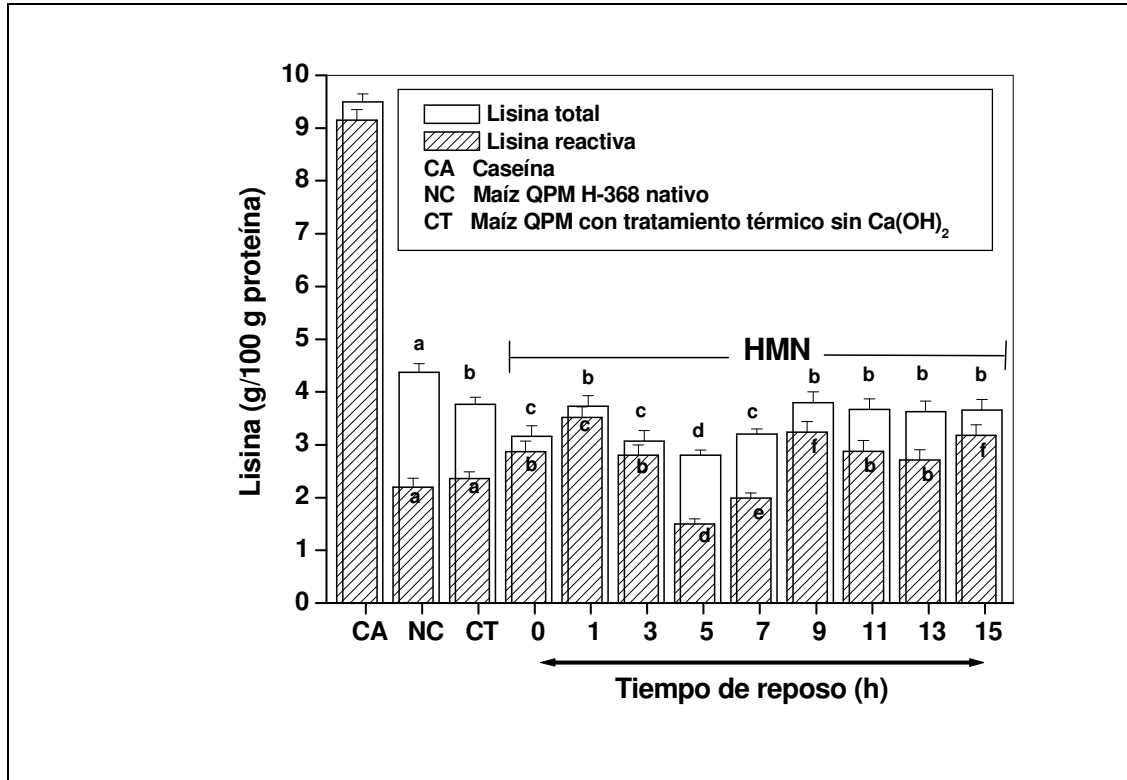


Figura 22. Contenido de lisina total y lisina reactiva en el grano nativo, en la muestra control y en las HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina *et al.*, 2008). Las barras con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0.05$) entre sí.

El aumento en el contenido de lisina reactiva en las primeras horas de reposo (1 a 3 horas), podría atribuirse a la liberación de este aminoácido a partir de las proteínas localizadas en las capas más externas del endospermo del grano. El aumento de lisina reactiva en los tiempos prolongados de reposo (9 a 15 h), podría corresponder a la lisina liberada a partir de las proteínas que pertenecen a las capas más internas del endospermo y al germen. Nuevamente, la reducción de lisina reactiva observada, podría explicarse en función de las modificaciones en las estructuras anatómicas que conforman el grano durante el proceso de nixtamalización. Resulta relevante destacar que entre el 90.82 y el 94.34 % de la lisina total presente en el grano nixtamalizado, se encuentra disponible en los tiempos iniciales de reposo (0, 1 y 3 h), en tanto que a las 5 y 7 h de

reposo, el porcentaje de la lisina total disponible fue del 53.57 y 62.18 % respectivamente. En los tiempos prolongados de reposo (9, 11, 13 y 15 h), el porcentaje de la lisina total que se encuentra disponible está entre el 74.65 y el 86.88 %. Estos valores son similares al reportado por Ortega *et al.* (1986), para el porcentaje de lisina total disponible en tortilla elaborada con maíz QPM (75.39 %) y con un tiempo de reposo de 16 h.

Estos resultados muestran un perfil completo del comportamiento de la lisina reactiva en el grano de maíz sometido a un tratamiento térmico a diferentes tiempos de reposo. A este respecto, Trejo-González *et al.* (1982) mencionan un contenido de lisina reactiva de 3.25 g/100 g proteína para maíz QPM nixtamalizado a 92 °C y con un tiempo de reposo entre 8 y 10 h. Por otra parte, Ortega *et al.* (1986) indican un valor de 2.95 g/100 g proteína para tortillas elaboradas a partir de maíz QPM con una temperatura de cocción de 92 °C y 16 h de reposo. Lo anterior, constituye una evidencia de que los resultados publicados por los autores anteriormente señalados, no son completamente discordantes entre sí. Esto probablemente, debido a que los valores reportados por estos investigadores corresponden a valores puntuales observados en la Figura 22.

6.2.4 Contenido de triptófano en el grano de maíz QPM H-368 nativo y HMN en función del tiempo de reposo

En la Figura 23 se presenta el contenido de triptófano en el grano nativo (NC), en la muestra control (CT) y en las harinas de maíz nixtamalizado (HMN) en función del tiempo de reposo.

La modificación en el contenido de triptófano en las HMN presenta dos regiones en función del tiempo. El primero de ellos corresponde a las HMN elaboradas a tiempos de reposo reducidos de 0 a 3 h, incluyendo a la CT, en donde a excepción de esta última muestra, no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al NC. En la segunda región (desde 5 hasta 15 h de reposo), se detectó una reducción significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de este aminoácido con respecto al NC. La Figura 23 demuestra que la reducción en el contenido de triptófano no es proporcional al tiempo de reposo.

La disminución en el contenido de triptófano en la muestra control fue del 17.54 % con respecto al grano nativo. Este comportamiento pudiera atribuirse al incremento en la proteína recuperada correspondiente a la fracción de α -, β -, δ - zeínas deficiente en triptófano, así como a la disminución en el contenido de proteína en la fracción de las glutelinas G₃ abundante en este aminoácido.

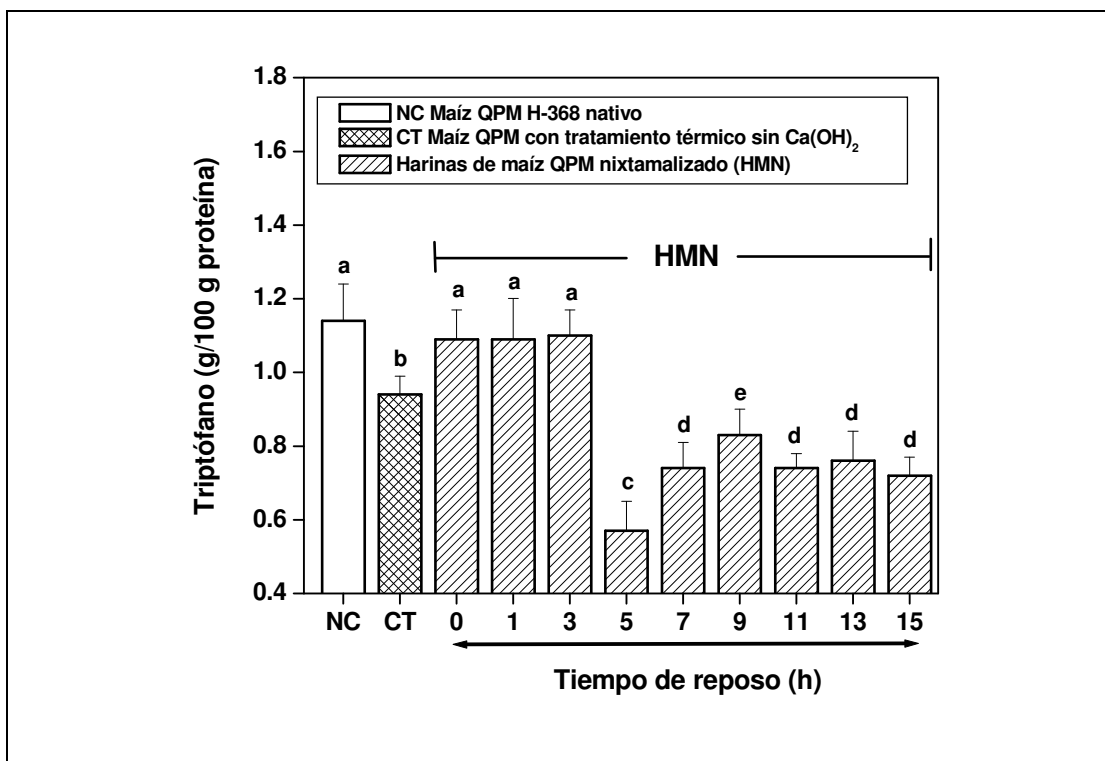


Figura 23. Contenido de triptófano en el grano nativo, en la muestra control y en las HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina *et al.*, 2008). Las barras con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0.05$) entre sí.

La reducción en el contenido de triptófano en las HMN obtenidas a las 0,1 y 3 h de reposo se mantuvo en un rango desde un 3.51 hasta un 4.38 % comparado con el NC. En el grano nixtamalizado con 5 h de reposo, se detectó la mayor reducción (50 %) en el contenido de triptófano con respecto al NC. La disminución de este aminoácido a las 5 h de reposo, también podría estar relacionada al igual que la lisina, con la pérdida de la capa aleurona durante la etapa de reposo.

Por otra parte, en los tiempos prolongados de reposo (7, 9, 11, 13 y 15 h) se observó una pérdida del 25.08, 27.14, 35.08, 33.33 y 36.84 % en el contenido de triptófano comparado con el contenido de este aminoácido en el grano sin procesar. El contenido de triptófano en la HMN es mayor al porcentaje de triptófano en tortillas elaboradas con maíz Tuxpeño-1 reportado por Ortega *et al.* (1986), en las que se observó una reducción del 15 % en el contenido de este aminoácido en el maíz QPM transformado en tortilla elaboradas a 92 °C y con 16 h de reposo; mientras que Bressani

et al. (1990) encontraron pérdidas en la concentración de triptófano en un rango de 9 a 37 % en maíz procesado a 96 °C y 12 h de reposo.

La correlación entre el contenido de triptófano y la proteína recuperada en la fracción de albúminas + globulinas, mostrada en la Figura 21, fue de $r = 0.36$, por lo tanto, las modificaciones en la distribución de la solubilidad de las proteínas explican parcialmente el comportamiento del contenido de triptófano en las HMN, en tanto que la intervención de otros factores como por ejemplo, la difusión de agua e hidróxido de calcio en las diferentes estructuras anatómicas del grano de maíz, pueden influir en los resultados observados.

El contenido de triptófano en las HMN es mayor al reportado por Ortega *et al.* (1986) y Sproule *et al.* (1988) en tortillas de maíz normal. Estos resultados son evidencia de que el contenido de triptófano en los productos nixtamalizados con maíz QPM, es mayor con respecto a sus homólogos de maíz normal.

6.2.5 Contenido de aminoácidos esenciales en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado

El promedio del contenido de aminoácidos esenciales para el grano de maíz nativo (NC), muestra control (CT) y las harinas de maíz nixtamalizado expresado en mg/g proteína se muestran en la Tabla 5. A partir de esta tabla se puede observar que los valores mínimos para todos los aminoácidos esenciales se detectaron entre las 3 y 7 h de reposo, con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) con respecto al grano nativo. La reducción en el contenido de aminoácidos esenciales en el grano nixtamalizado se detectó en un rango del 13.8 al 25 % comparado con el grano crudo. Estos valores son similares a los reportados por Bressani y Scrimshaw *et al.* (1958), Sproule *et al.* (1988) y Ortega *et al.* (1986).

La disminución en el contenido de aminoácidos esenciales en las HMN podría atribuirse al pH alcalino (12.2) en el líquido de cocción, ya que las proteínas prolaminas, las albúminas y globulinas presentan un punto isoeléctrico entre 6.5 y 4.5 (Csonka y Jones, 1927). Lo anterior significa que estas fracciones proteínicas presentes en el grano de maíz, se solubilizan en el líquido de cocción y son fácilmente removidas durante las etapas de drenado y lavado del proceso.

De manera puntual, se observa que los valores mínimos en el contenido de los aminoácidos histidina (His) y arginina (Arg) se observaron a las 5 h de reposo. La fracción de albúminas y globulinas son abundantes en ambos aminoácidos (Wilson, 1983). Acorde

con la Figura 21, la proteína recuperada correspondiente a esta fracción también presenta los valores mínimos entre las 3 y 5 h de reposo.

El contenido de metionina (Met) en las HMN es mayor en las etapas iniciales de reposo y se reduce desde las 11 hasta las 15 h de reposo. A este respecto, las prolaminas (β - y δ - zeínas) son abundantes en aminoácidos azufrados (Esen *et al.*, 1985; Swarup *et al.*, 1995). De acuerdo con la Figura 21, en los tiempos cortos de reposo (desde 0 hasta 3 h), la proteína recuperada para esta fracción presenta los valores máximos y se reduce en los tiempos prolongados de reposo.

El contenido de fenilalanina (Phe), treonina (Thre) y valina (Val) presentan los valores mínimos en el grano de maíz nixtamalizado y reposado durante 3, 5 y 7 h. Wilson (1983) reportó que la fracción de globulinas + albúminas contienen niveles elevados de estos tres aminoácidos. Por lo tanto, la reducción en el contenido de estos aminoácidos en el grano procesado, podría ser el resultado del comportamiento de la proteína recuperada para la fracción de globulinas+ albúminas mostrada en la Figura 21.

Con relación al contenido de isoleucina (Iso) y leucina (Leu), ambos aminoácidos disminuyeron por efecto del tiempo de reposo; sin embargo, esta reducción no es proporcional con el tiempo (Tabla 5). La relación isoleucina/leucina (Ile/Leu) se incrementó como consecuencia de la reducción en el contenido de leucina. No se detectó una correlación entre la relación Ile/Leu y el tiempo de reposo ($r = 0.30$).

En la Tabla 5 también se presenta la calificación química (CQ) de las harinas nixtamalizadas, en donde se observa que esta se reduce por efecto del proceso de nixtamalización. El aminoácido limitante en todas las harinas nixtamalizadas resultó ser la metionina. Con relación a este punto, en algunos casos tanto en las proteínas de origen animal como vegetal, el aminoácido limitante es un azufrado. Lo anterior debido a que durante el procesamiento de los alimentos a valores de pH extremos, como lo es el caso del tratamiento térmico alcalino, se destruyen los grupos sulfhidrilo. Se presume que este fenómeno es debido a la ionización de los grupos azufrados que despliegan las cadenas polipeptídicas de las proteínas, al intentar exponerse al ambiente acuoso (Damodaran, 2000).

Tabla 5. Contenido de aminoácidos esenciales (mg/g de proteína) en las muestras experimentales

Muestras	His ^d	Arg ^d	Lys ^d	Trp ^d	Tre ^d	Val ^d	Met ^d	Phe ^d	Ile ^d	Leu ^d	Ile/Leu	Calificación Química (CQ) ⁱ
NC ^a	52.0 ± 1.0 ^a	64.0 ± 1.3 ^a	43.7 ± 1.5 ^a	11.4 ± 1.0 ^a	52.0 ± 1.0 ^a	48.0 ± 1.0 ^a	11.0 ± 0.2 ^a	57.0 ± 1.1 ^a	36.0 ± 0.7 ^a	61.0 ± 1.1 ^a	0.59 ^a	19.3 ^a
CT ^b	51.0 ± 1.0 ^{ab}	63.0 ± 1.3 ^{ab}	37.7 ± 1.7 ^b	9.4 ± 0.5 ^b	47.0 ± 0.9 ^b	45.0 ± 0.9 ^b	11.0 ± 0.2 ^b	55.0 ± 1.1 ^{ab}	35.0 ± 0.7 ^{ab}	56.0 ± 1.1 ^b	0.62 ^{ab}	19.3 ^{ab}
0 ^c	48.0 ± 0.9 ^{bc}	62.0 ± 1.2 ^{abc}	31.6 ± 1.3 ^c	10.9 ± 0.8 ^a	46.0 ± 0.9 ^{bc}	45.0 ± 0.9 ^b	9.0 ± 0.2 ^c	55.0 ± 1.0 ^d	35.0 ± 0.7 ^{ab}	50.0 ± 1.0 ^c	0.70 ^{ef}	15.8 ^{bc}
1 ^c	46.0 ± 0.9 ^{cde}	60.0 ± 1.2 ^{bcd}	37.3 ± 2.0 ^b	10.9 ± 1.1 ^a	45.0 ± 0.9 ^{bc}	42.0 ± 0.8 ^{cd}	9.0 ± 0.2 ^c	55.0 ± 1.1 ^{bc}	34.0 ± 0.6 ^{bc}	48.0 ± 0.9 ^{cd}	0.71 ^f	15.8 ^{bc}
3 ^c	45.0 ± 0.9 ^{de}	58.0 ± 1.2 ^{de}	30.7 ± 2.0 ^c	11.1 ± 0.7 ^a	42.0 ± 0.9 ^d	38.0 ± 0.7 ^e	8.0 ± 0.2 ^d	52.0 ± 1.0 ^{cd}	34.0 ± 0.7 ^{bc}	47.0 ± 0.9 ^d	0.72 ^f	14.0 ^{cd}
5 ^c	44.0 ± 0.8 ^e	55.0 ± 1.1 ^e	28.0 ± 2.0 ^d	5.7 ± 0.8 ^c	44.0 ± 0.9 ^{cd}	34.0 ± 0.6 ^f	6.0 ± 0.2 ^f	43.0 ± 0.9 ^f	31.0 ± 0.6 ^e	48.0 ± 1.0 ^{cd}	0.64 ^{bc}	10.5 ^e
7 ^c	46.0 ± 0.9 ^{cde}	59.0 ± 1.2 ^{cd}	32.0 ± 1.0 ^c	7.4 ± 0.7 ^d	44.0 ± 0.9 ^{cd}	41.0 ± 0.8 ^d	8.0 ± 0.2 ^d	47.0 ± 0.9 ^e	33.0 ± 0.7 ^{cd}	48.0 ± 1.0 ^{cd}	0.68 ^{def}	14.0 ^{cd}
9 ^c	45.0 ± 0.9 ^{de}	59.0 ± 1.2 ^{cd}	38.0 ± 1.0 ^b	8.3 ± 0.7 ^e	45.0 ± 0.9 ^{bc}	44.0 ± 0.8 ^{bc}	8.0 ± 0.2 ^d	47.0 ± 0.9 ^e	32.0 ± 0.6 ^{de}	49.0 ± 1.0 ^{cd}	0.65 ^{bcd}	14.0 ^{cd}
11 ^c	46.0 ± 0.9 ^{cde}	60.0 ± 1.2 ^{bcd}	36.7 ± 2.0 ^b	7.4 ± 0.4 ^d	46.0 ± 0.9 ^{bc}	40.0 ± 0.8 ^{de}	8.0 ± 0.2 ^d	47.0 ± 0.9 ^e	33.0 ± 0.7 ^{cd}	50.0 ± 1.0 ^c	0.66 ^{bcd}	14.0 ^{cd}
13 ^c	48.0 ± 0.9 ^{bc}	59.0 ± 1.2 ^{cd}	36.3 ± 2.0 ^b	7.6 ± 0.8 ^d	7.0 ± 0.9 ^b	40.0 ± 0.8 ^{de}	7.0 ± 0.2 ^e	44.0 ± 0.9 ^f	32.0 ± 0.6 ^{de}	50.0 ± 1.0 ^c	0.64 ^{bc}	12.3 ^{de}
15 ^c	47.0 ± 0.9 ^{cd}	59.0 ± 1.2 ^{cd}	36.6 ± 2.0 ^b	7.2 ± 0.5 ^d	7.0 ± 0.9 ^b	41.0 ± 0.8 ^d	8.0 ± 0.2 ^d	43.0 ± 0.8 ^f	32.0 ± 0.6 ^{de}	48.0 ± 0.9 ^{cd}	0.66 ^{cde}	14.0 ^{cd}
Proteína patrón	22	-	70	17	47	66	57	93	54	86	0.63 ^{ab}	100.0 ^f

Fuente: Rojas-Molina *et al.*, 2008.

NC = Maíz QPM H-368 nativo

CT = Maíz QPM con tratamiento térmico sin Ca(OH)₂

^a QPM H-368 nativo o crudo

^b QPM H-368 con tratamiento térmico sin Ca(OH)₂

^c Tiempo de reposo (h)

^d Valores con la misma letra no son diferentes significativamente entre sí (p < 0.05)

His = Histidina

Arg = Arginina

^{*} Valores correspondientes al huevo (FAO/OMS/UNU, 1985)

ⁱ CQ = [mg de aminoácido/g proteína (ensayo) / mg aminoácido/g proteína (referencia)] x 100

Lys = Lisina

Trp = Triptófano

Tre = Treonina

Val = Valina

Met = Metionina

Phe = Fenilalanina

Leu = Leucina

Ile = Isoleucina

6.2.6 Digestibilidad de la proteína en el grano de maíz QPM H-368 nativo y nixtamalizado

La digestibilidad de la proteína *in vitro* en el grano de maíz nativo y nixtamalizado en forma de harinas (HMN) se muestra en la Figura 24.

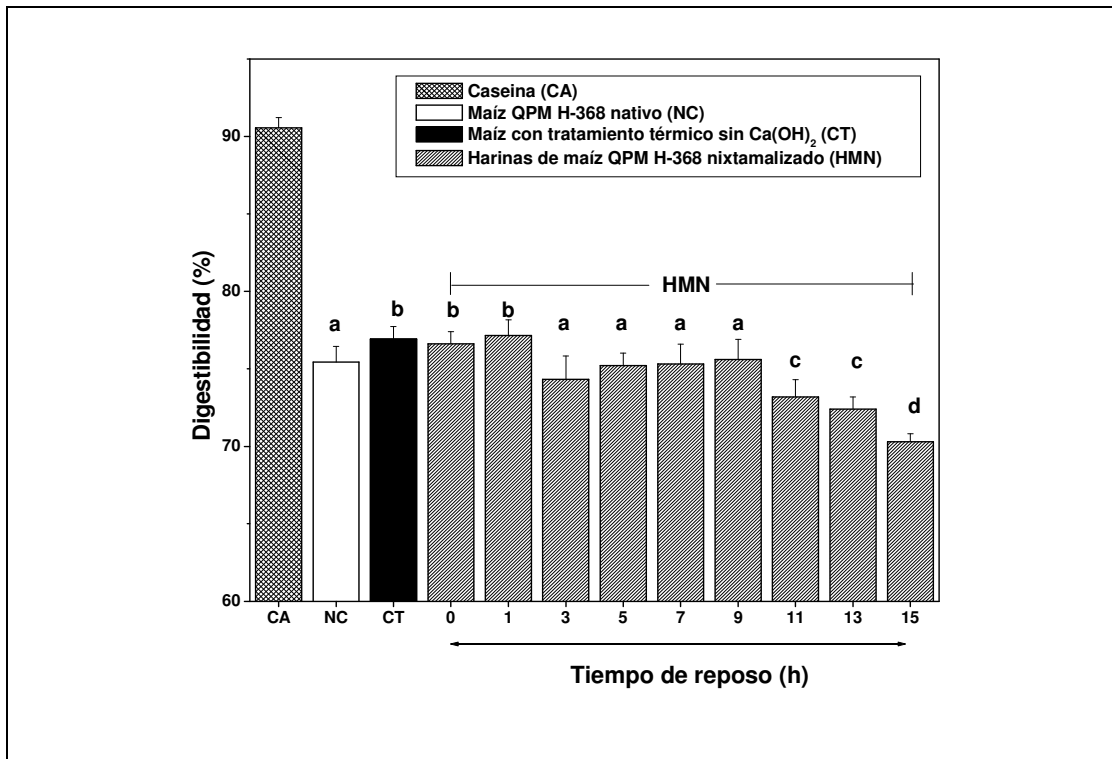


Figura 24. Digestibilidad de la proteína *in vitro* en la caseína, en el grano nativo, en la muestra control y en las HMN en función del tiempo de reposo (Rojas-Molina *et al.*, 2008). Las barras con la misma letra no son diferentes significativamente ($p < 0.05$) entre sí.

A partir de la figura anterior se puede observar que la digestibilidad de la proteína en el grano de maíz nixtamalizado se modificó en un rango desde 70.3 ± 0.51 hasta 77.16 ± 1.1 como se muestra en la Figura 24. No se detectó una correlación lineal entre el tiempo de reposo y la digestibilidad ($r = 0.25$). No obstante, es importante destacar que el valor de las digestibilidades observadas en las HMN obtenidas a las 11, 13 y 15 h de reposo fueron significativamente inferiores ($p \leq 0.05$) al valor correspondiente al grano nativo. Por esta razón, la disminución en la digestibilidad de la proteína detectada a estos tiempos de reposo, están acorde con los trabajos previamente reportados por Sproule *et al.* (1998) y Ortega *et al.* (1998) quienes señalan una disminución en la digestibilidad de la proteína del maíz nixtamalizado con 12 y 16 h de reposo respectivamente.

Se detectó un incremento en el contenido de proteína recuperada en la fracción correspondiente a las glutelinas G_3 y en el residuo para los tiempos de reposo prolongados (11, 13 y 15 h) con respecto al NC que se presenta en la Figura 21. Este comportamiento también fue observado por Paredes y Mora (1983), Ortega *et al.* (1986) y Vivas *et al.* (1987). Estos autores señalan que la presencia de compuestos no digeribles presentes en esta fracción proteínica y el residuo, podrían ser los responsables de la disminución en la digestibilidad de la proteína, en donde el hidróxido de calcio empleado durante el proceso de nixtamalización, es el responsable de la modificación en la estructura de las proteínas a través de la formación de enlaces cruzados y las reacciones de racemización.

6.3 Resultados de los objetivos particulares 4 y 5

6.3.1 Contenido de calcio residual en el grano de maíz nixtamalizado en forma de harinas

La Figura 25 muestra el contenido de calcio en el grano nativo, en el grano de la muestra control y en el grano nixtamalizado en forma de harinas en función del tiempo de reposo.

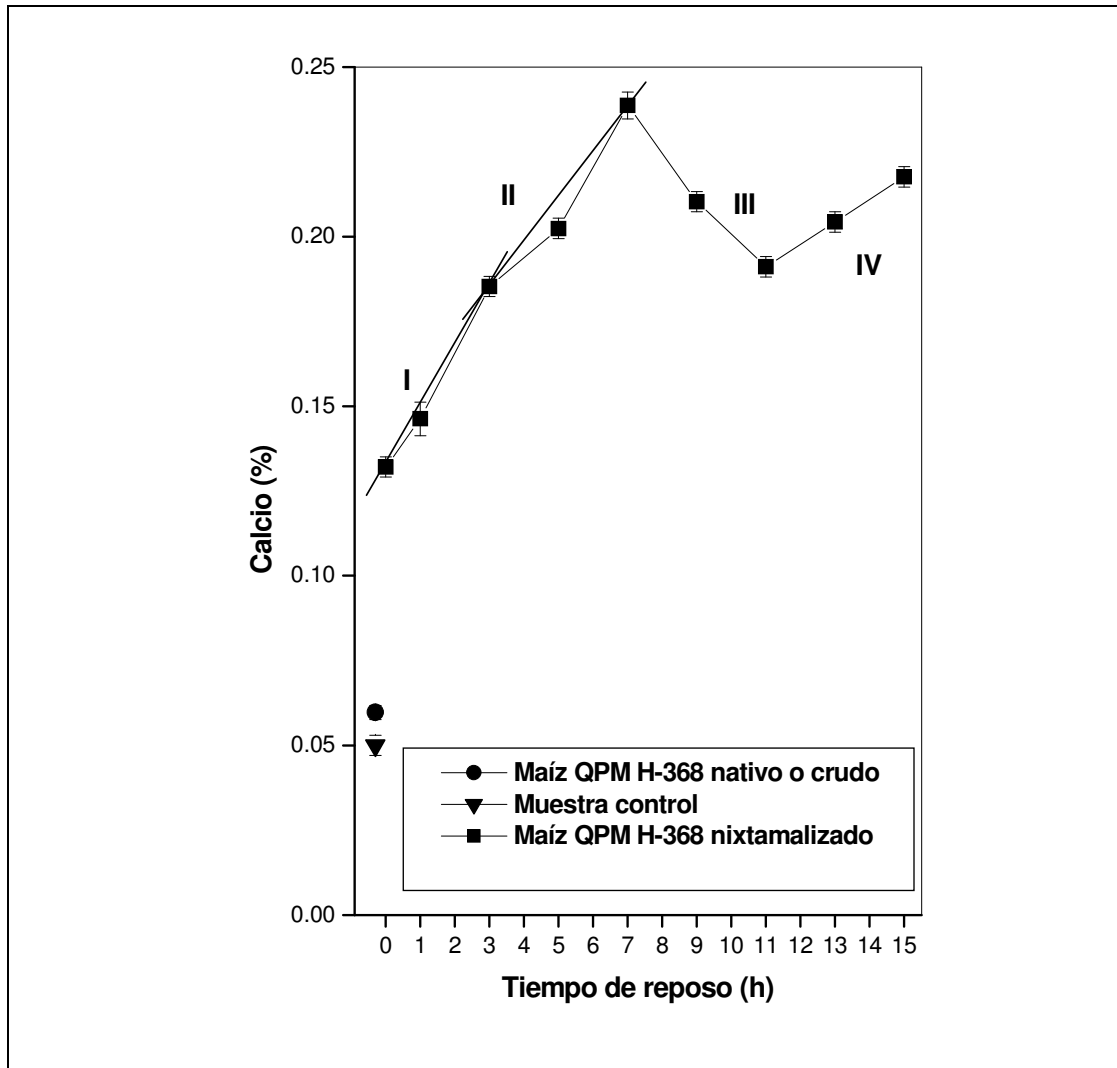


Figura 25. Contenido de calcio en el grano total de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo, en la muestra control y en el grano nativo.

En la Figura 25 se puede observar que la tendencia que muestran los datos es muy similar al perfil reportado por Fernández *et al.* (2004). Estos autores determinaron que el

contenido de calcio en harinas de maíz variedad Toluca nixtamalizado a 92 °C y detectaron un valor máximo en el contenido de calcio de 0.24 %. Serna *et al.* (1990) también describieron un incremento en el contenido de calcio en el grano de maíz nixtamalizado de 0.01 % en el grano nativo a 0.16 % en el grano transformado en tortilla.

Empleando el modelo fenomenológico propuesto por Fernández *et al.* (2002; 2004) y sustentado con imágenes obtenidas mediante LV-SEM (sección 6.3.4), se tiene que la difusión de los iones de calcio al interior del grano de maíz durante la nixtamalización no es un proceso lineal ($r = 0.71$), debido a la morfología del grano. Lo anterior significa que el grano de maíz debe considerarse como un sistema multicapa (pericarpio-endospermo-germen), cuyas estructuras muestran propiedades fisicoquímicas diferentes.

El análisis para las modificaciones en el contenido de calcio en función del tiempo de reposo puede realizarse dividiendo la gráfica de la Figura 25 en cuatro etapas. La etapa I comprende desde las 0 h de reposo hasta el primer punto de inflexión en la curva ($0 < t < 3$ h), en la cual la difusión de los iones de calcio tiene lugar principalmente en el pericarpio. También representa la habilidad de esta estructura para retener calcio en forma de sales de calcio y calcio iónico (González *et al.*, 2004), manifestándose con un incremento en el contenido de calcio y una dependencia lineal con el tiempo de reposo ($r = 0.96$).

En el límite de la etapa I y II, el cambio de pendiente se caracteriza con un tiempo crítico (t_c), que está asociado con la permeabilidad parcial (percolación) del pericarpio. Lo anterior significa que a este tiempo característico para esta etapa del proceso, la solución alcalina promueve cambios fisicoquímicos en la estructura del pericarpio, lo que permite la entrada directa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y agua hacia el germen y el endospermo (etapa II). Esto es debido a que los daños irreversibles ocasionados en el pericarpio, que es la primera estructura en contacto con el álcali, permiten que ésta ya no represente una barrera física para la difusión de calcio a las estructuras internas del grano. El valor de t_c calculado de acuerdo con la metodología descrita por Rodríguez *et al.* (1996) fue de 3.2 h.

La etapa III corresponde a una disminución significativa ($p < 0.05$) en el contenido de calcio con respecto al valor máximo ($7 < t < 11$ h), esta reducción es atribuida a la pérdida de pericarpio por efecto del tiempo de reposo y del lavado, así como a la eliminación de fracciones del endospermo y germen.

Finalmente, la etapa IV muestra un incremento en el contenido de calcio, el cual puede estar asociado con la fijación de este ión en las capas internas del endospermo y el germen. Es importante señalar que de acuerdo con Zazueta *et al.* (2002), la entrada de

calcio hacia el interior del grano también tiene lugar a través de la cofia directamente hacia el germen.

6.3.2 Contenido de calcio en el endospermo del grano de maíz nixtamalizado

La Figura 26 representa el contenido de calcio en el endospermo total, en las capas más externas del endospermo (10 % correspondiente al primer raspado), el siguiente 10 % (segundo raspado) y en las capas más internas que pertenecen al 80 % remanente en función del tiempo de reposo.

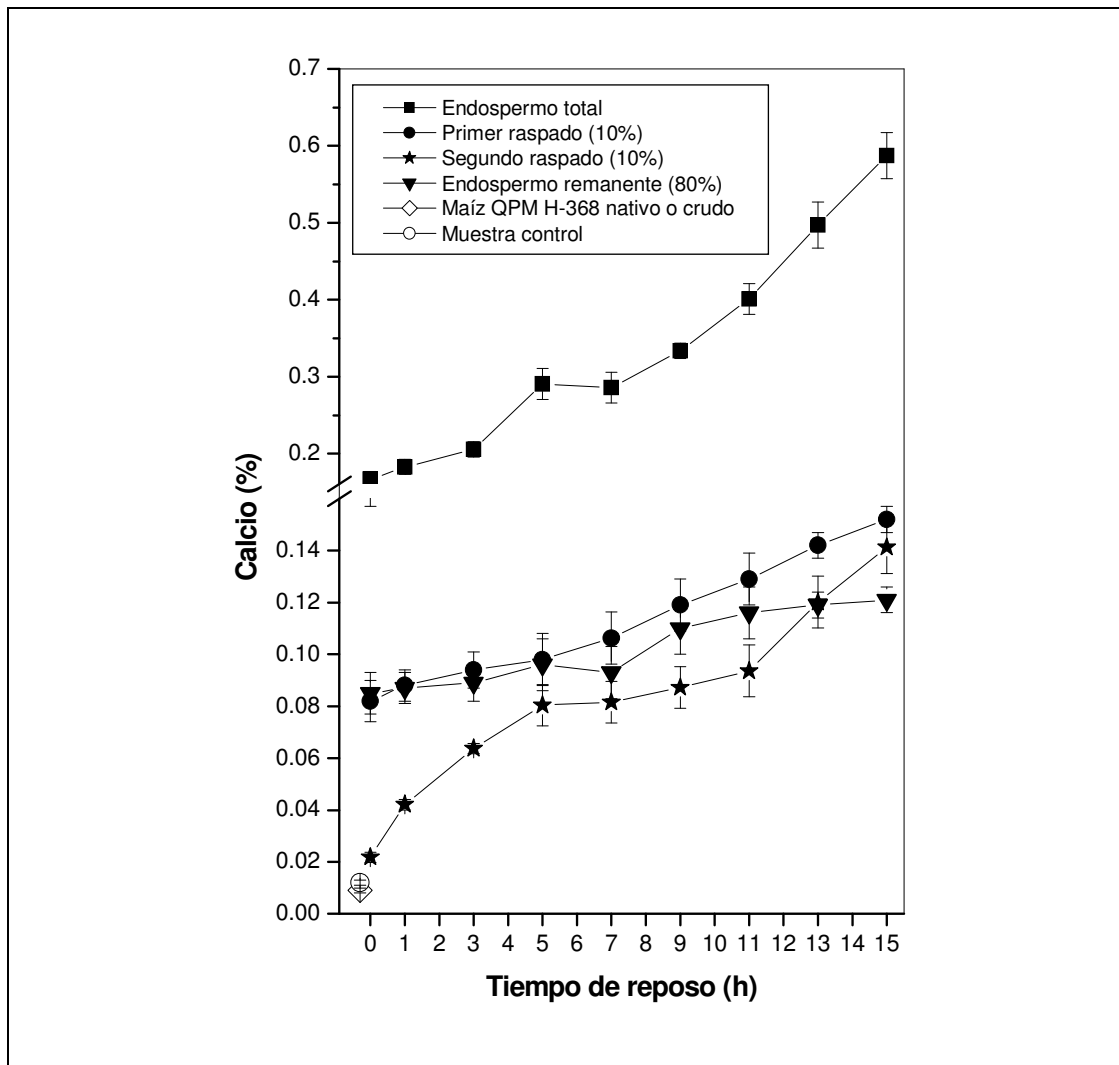


Figura 26. Contenido de calcio en el endospermo total, en el primer raspado (10 % w/w del endospermo total), en el segundo raspado (subsiguiente 10 %), en el 80 % remanente del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo, en la muestra control y en el grano nativo.

En la Figura 26 se observa que el contenido de calcio en el endospermo total, en las capas externas y en las capas internas de esta estructura se incrementa en forma lineal en función del tiempo de reposo. Los coeficientes de correlación de Pearson para la relación entre estas variables son $r = 0.97$, $r = 0.97$ y $r = 0.94$, respectivamente. Es importante mencionar, que estos coeficientes fueron mayores con respecto al coeficiente observado para la relación entre el contenido de calcio en las HMN y el tiempo de reposo ($r = 0.71$). El incremento en el contenido de calcio en las capas más externas del endospermo para los granos de esta variedad de maíz, de 0 a 15 h de tiempo de reposo fue alrededor del 300 % comparado con el grano crudo. A través de la inspección de los granos de maíz nixtamalizados mediante LV-SEM (sección 5.16), fue posible observar como a partir de las 3 h de reposo el pericarpio se degrada, lo que facilita su remoción. Esto favorece que la solución alcalina, tenga libre acceso a las capas externas del endospermo, dando lugar a que el contenido de calcio en esta estructura se incremente.

La Figura 26 es muy importante desde el punto de vista fisicoquímico, porque permitió establecer la estrategia para el estudio del fenómeno de gelatinización del almidón en el endospermo del grano que se presentan en la siguiente sección. Lo anterior debido a que la figura 26, constituye una evidencia de que el calcio en el endospermo está presente únicamente en el 20 % de esta estructura, es decir, en las capas más externas, las cuales están constituidas por endospermo córneo, ya que en el 80 % remanente el contenido de calcio fue menor. Esto también significa que la posible interacción entre las proteínas del endospermo con el calcio, se circunscribe únicamente en el 20 % de esta estructura. Con relación a este punto, resulta relevante señalar que las capas más externas del endospermo están constituidas predominantemente de endospermo vítreo, cuya matriz proteínica se encuentra adherida a los gránulos de almidón y es más abundante que en el endospermo harinoso. Por esta razón, los cambios en las transiciones de fase de la gelatinización del almidón localizado en el endospermo del maíz nixtamalizado, así como la relación entre el contenido de calcio y el contenido de lisina y triptófano, se estudió en las capas externas e internas del endospermo de manera independiente.

6.3.3 Análisis del grado de gelatinización del almidón en diferentes capas del endospermo del maíz nixtamalizado por DSC

Para confirmar que el almidón localizado en las capas externas de esta estructura presenta el fenómeno de gelatinización por efecto de la nixtamalización, se llevaron a cabo análisis mediante DSC en las capas internas y externas del endospermo.

La Figura 27 muestra los termogramas obtenidos mediante DSC para las muestras nixtamalizadas a 92 °C para 0, 3, y 7 horas de reposo.

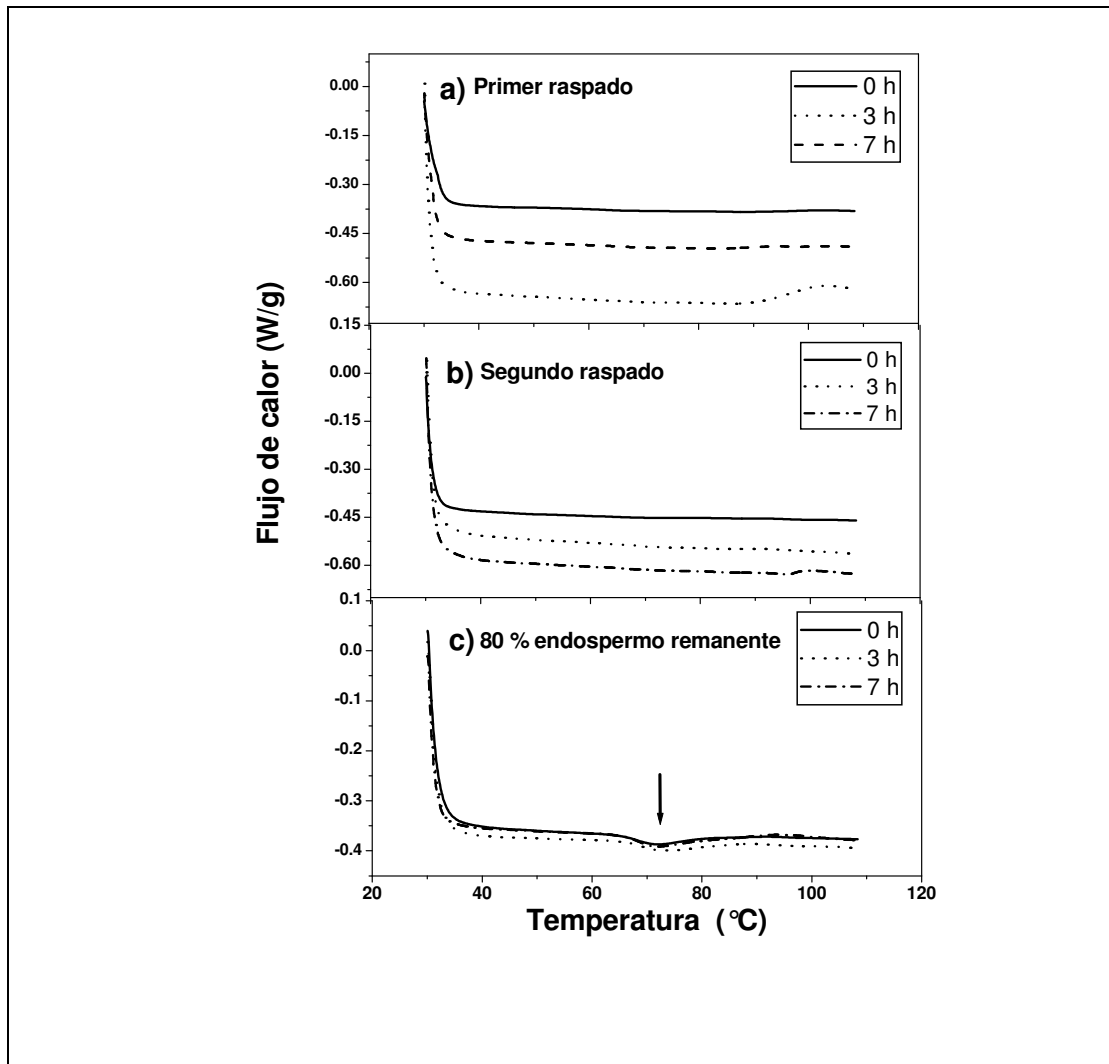


Figura 27. Termogramas obtenidos mediante DSC convencional del endospermo del grano de maíz nixtamalizado correspondientes al a) primer raspado, b) segundo raspado y c) 80 % remanente (Rojas-Molina *et al.*, 2007).

Cabe destacar que también se obtuvieron los termogramas correspondientes a los diferentes tiempos de reposo evaluados en este estudio; sin embargo, únicamente se están mostrando los obtenidos a tres tiempos de reposo, por la razón de que a las 0 h concluye la etapa de cocción del grano, las 3 h está relacionada con la percolación del pericarpio y finalmente, las 7 h representa la remoción parcial del pericarpio. Así mismo, las modificaciones fisicoquímicas que se presentan en esta estructura, promueven la entrada directa de Ca(OH)_2 y agua al endospermo.

En la Figura 27 a) y b) se observa que las capas más externas del endospermo, es decir, las del 10 % (primer raspado) y subsecuente 10 % (segundo raspado), no presentan el pico endotérmico característico del almidón del maíz nativo, el cual se encuentra entre los 64 y 81 °C (Sandhu *et al.*, 2004). El pico de las capas más externas del endospermo del maíz QPM H-368 sin ningún tratamiento, se detectó a 72.91 °C, este pico está asociado al fenómeno de gelatinización del almidón. Estos resultados indican que por efecto del tratamiento térmico alcalino, el almidón contenido en las capas más externas del endospermo se gelatinizó, lo que confirma los resultados de difracción de rayos X publicados por Rojas *et al.* (2007). La Figura 27 c) muestra el termograma correspondiente al 80 % remanente del endospermo de los granos de maíz nixtamalizados. Es interesante observar que para las 0, 3 y 7 h de reposo, estas muestras presentan el pico endotérmico característico del almidón, el cual podría pertenecer a la amilosa y amilopectina que no ha sido modificada por efecto del tratamiento térmico alcalino, debido a la ausencia de agua y que, por lo tanto, aun conservan su estructura cristalina. Este mismo comportamiento se observó para las muestras obtenidas a las 1, 5, 9, 11, 13 y 15 h de reposo. No se detectaron cambios significativos asociados con un incremento en la temperatura de gelatinización, mismo que ha sido relacionado con el fenómeno de anillado (templado) (Qi *et al.*, 2005).

Durante la gelatinización los gránulos de almidón se hinchan, lo que resulta en un aumento de volumen que da lugar a modificaciones en la morfología de las estructuras asociadas a los gránulos, como por ejemplo, la ruptura de la matriz proteínica. Estas modificaciones se corroboraron mediante imágenes obtenidas a través de LV-SEM, las cuales se muestran en la siguiente sección.

6.3.4 Transformaciones morfológicas del endospermo del grano de maíz nixtamalizado en función del tiempo de reposo por LV-SEM

Las modificaciones en la estructura cristalina del endospermo, también fueron analizadas mediante microfotografías obtenidas por LV-SEM.

Las transformaciones morfológicas que experimenta el maíz por efecto del tratamiento térmico alcalino, ocurren desde el exterior hacia el interior del grano. El pericarpio recubre las estructuras internas del grano: el endospermo y el germen. Por esta razón, constituye la primera estructura en contacto con la solución alcalina y en consecuencia los cambios físicos y químicos que experimenta, gobiernan la difusión de agua y calcio hacia el interior del grano (Hurtado-Castañeda *et al.*, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2007). En la Figura 28 se presenta una imagen representativa del pericarpio del grano de maíz nativo, en la cual es posible observar las fibras unidireccionadas de celulosa, hemicelulosa y lignina intacta (F).

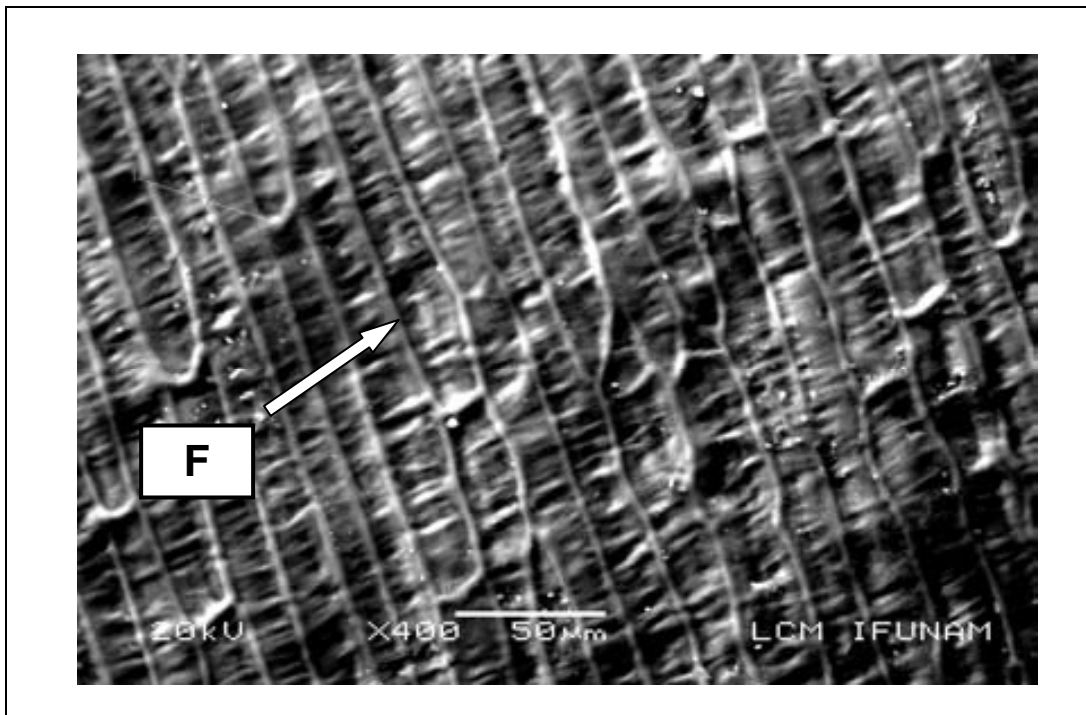


Figura 28. Micrografía del pericarpio del maíz QPM H-368 nativo, en donde se observan las fibras unidireccionadas de celulosa, hemicelulosa y lignina (F) (Gutiérrez *et al.*, 2007).

La Figura 29 corresponde al pericarpio del grano de maíz nixtamalizado a las 0 h de reposo, en donde la capa cerosa ó epidermis desaparece y las fibras direccionadas

comienzan a experimentar un proceso de degradación. Adicionalmente, las áreas blancas en la superficie del pericarpio (ver recuadro) están relacionadas con compuestos de calcio, que de acuerdo con un análisis elemental llevado a cabo por la técnica de EDS (Electron Diffraction Spectroscopy) fueron identificados por Gutiérrez *et al.* (2007) como CaCO_3 (calcita). La presencia de este compuesto es debida al proceso de carbonatación que tiene lugar durante la cocción y la etapa de reposo, el cual está relacionado con la reacción química que ocurre entre el CO_2 de la atmósfera y el Ca(OH)_2 de la solución alcalina (Galván-Ruíz *et al.*, 2007).

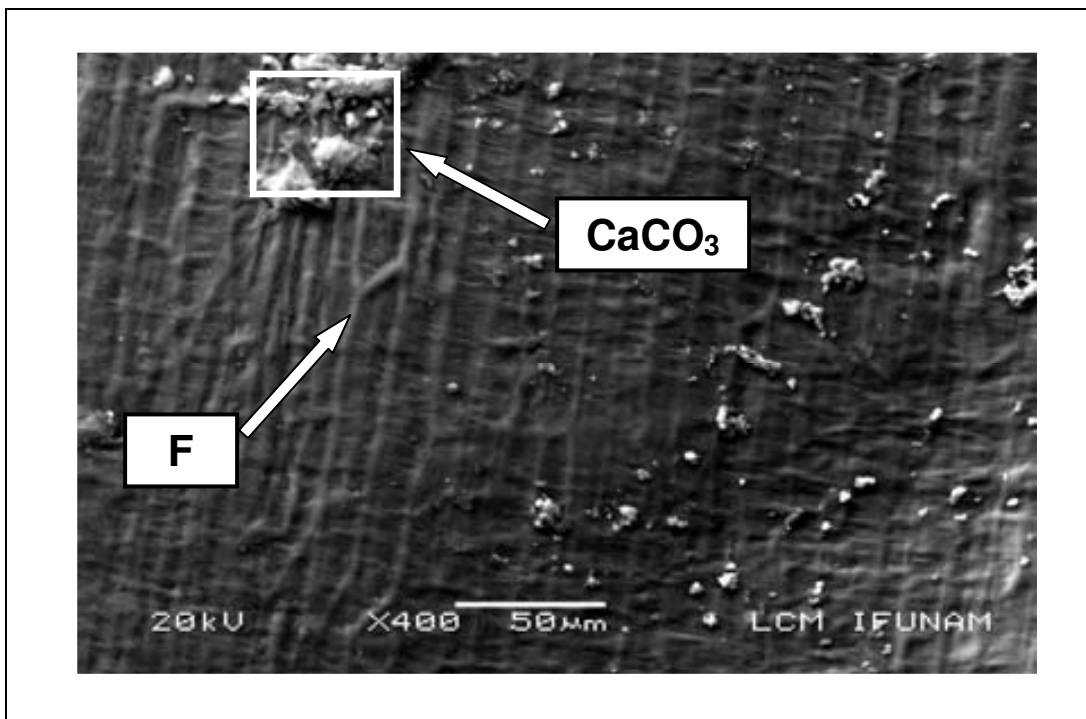


Figura 29. Micrografía del pericarpio del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH)_2 a 0 h de reposo, en donde se aprecian las fibras unidireccionales de celulosa, hemicelulosa y lignina adelgazadas (F) y cristales de CaCO_3 (Gutiérrez *et al.*, 2007).

En la Figura 30 se muestra un análisis más detallado del pericarpio y del endospermo del grano de maíz objeto de estudio nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo. Las micrografías fueron captadas a diferentes aumentos para explicar con detalle las transformaciones que experimentan cada una de las estructuras anatómicas del grano. En la Figura 30 a) se observa la existencia de microporos (x1000), los cuales confirman que ocurre la percolación de esta estructura. Los microporos contribuyen a la

apertura de un conjunto de rutas que permiten la libre entrada de calcio y agua hacia el interior del grano de maíz.

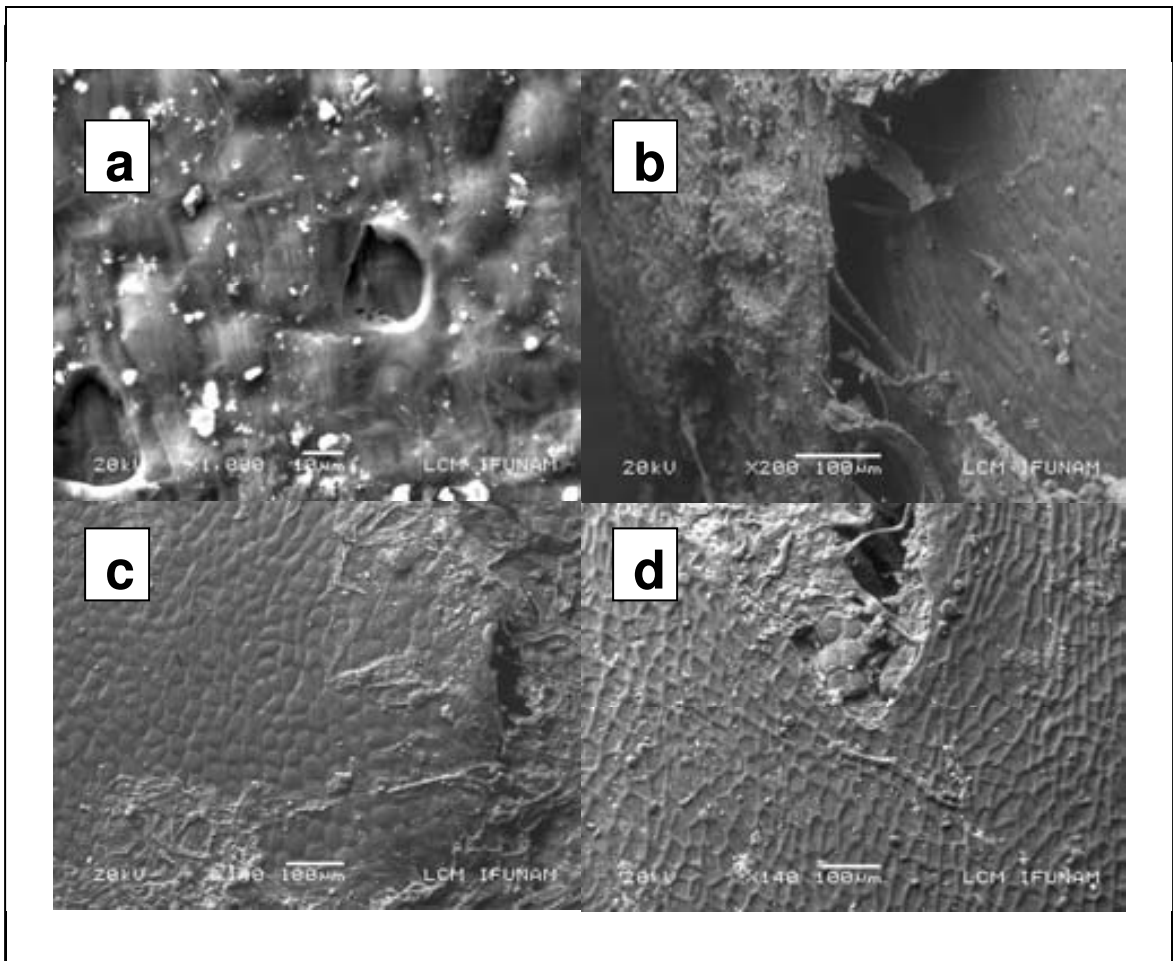


Figura 30. Micrografías del pericarpio y endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH)₂ a) 3 h, b) 5 h, c) 7 h y d) 9 h de reposo (Gutiérrez *et al.*, 2007).

La figura 30 b) muestra el estado del pericarpio y el endospermo a las 5 h de reposo (x200). En esta micrografía es evidente la pérdida de pericarpio, así como la separación entre el pericarpio y el endospermo, de modo que las capas más externas del endospermo se hacen visibles, dejando expuesta la capa de aleurona al efecto del líquido de cocción y desprotegidos a los gránulos de almidón del endospermo. La figura 30 c) corresponde al estado del pericarpio/endospermo a las 7 h de reposo (x140). Los macroporos presentes en el endospermo evidencian la interacción directa entre los componentes del endospermo principalmente la matriz proteínica y la solución alcalina;

sin embargo, algunas capas delgadas del pericarpio aún permanecen unidas al endospermo. A las 9 h de reposo, en la Figura 30 d) (x140), los macroporos incrementan su tamaño permitiendo la entrada de calcio y agua a las capas más internas del endospermo y germen.

La Figura 31 muestra una imagen de la matriz proteínica (MP) en el grano nativo en la que se puede apreciar que la matriz proteínica que recubre a los gránulos de almidón (GA) es más gruesa en el grano nativo.

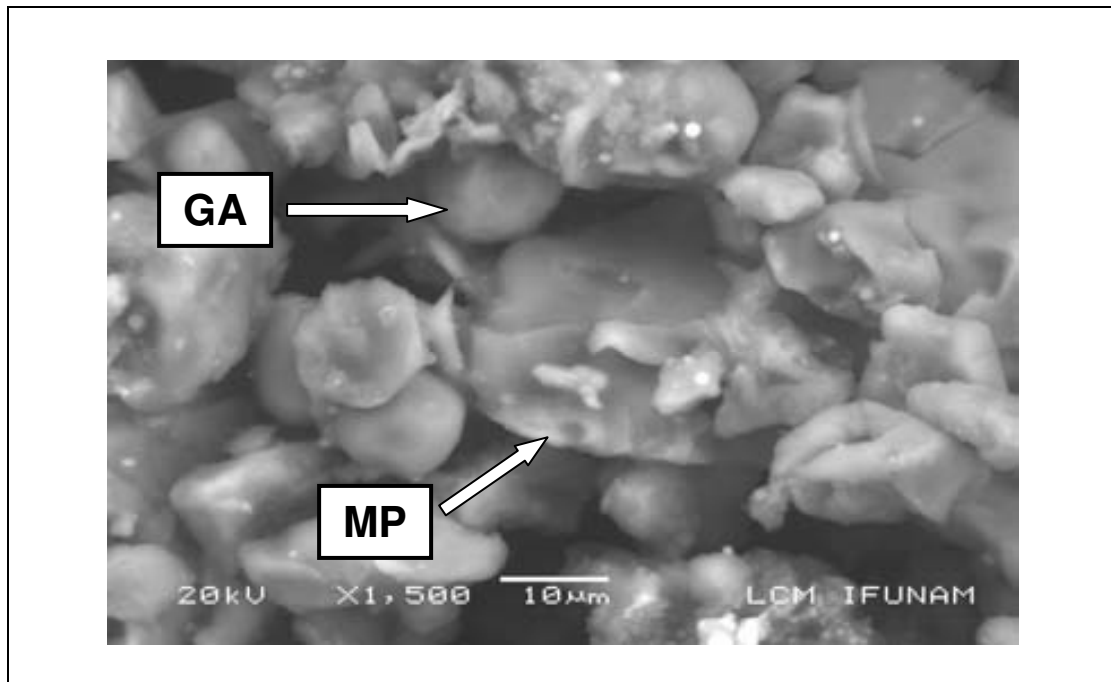


Figura 31. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nativo, donde se observan los gránulos de almidón (GA) y la matriz proteínica (MP).

En la Figura 32 se muestra el adelgazamiento de la matriz proteínica por efecto del tratamiento térmico del endospermo del grano nixtamalizado a las 5 h de reposo.

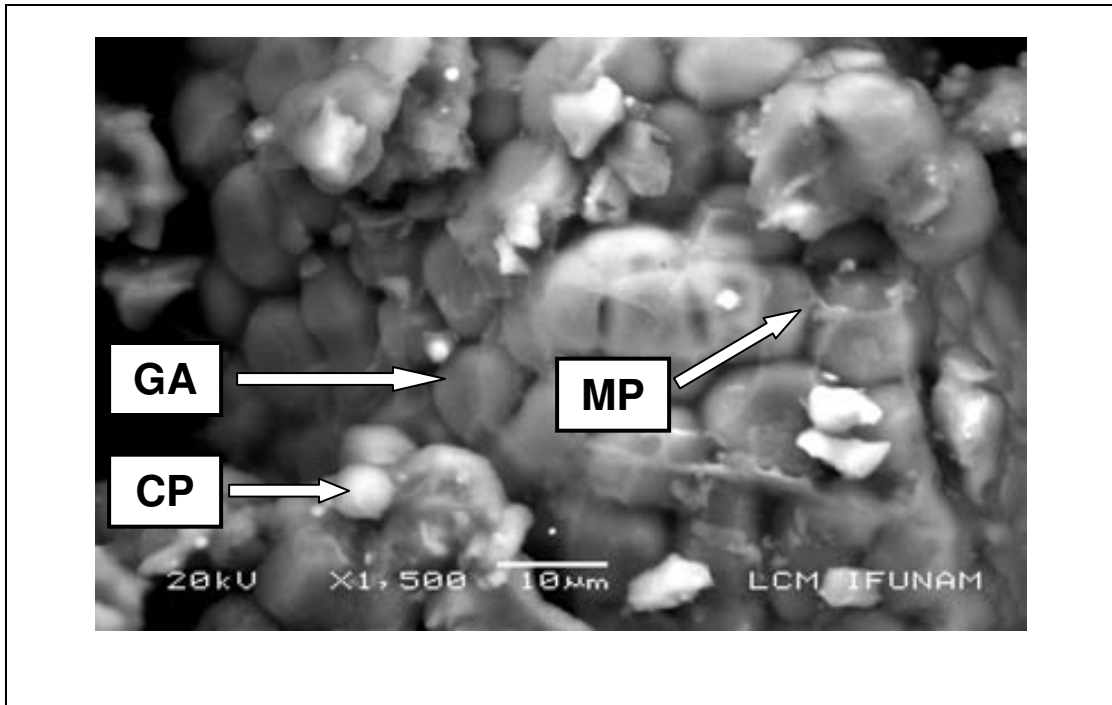


Figura 32. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% Ca(OH)₂ a 5 h de reposo, donde se observa la matriz proteínica (MP), los gránulos de almidón (GA) y los cuerpos proteínicos (CP).

La Figura 33 pertenece al endospermo del grano con 7 h de reposo, en donde los gránulos de almidón (GA) se observan de mayor tamaño, en tanto que el daño en la matriz proteínica (MP) que los recubre es más evidente.

Finalmente, la Figura 34 muestra aspectos del endospermo del maíz nixtamalizado con 9 h de reposo, en donde se aprecian trazas de la matriz proteínica y mayor desorden en los paquetes de gránulos de almidón comparado con los correspondientes al endospermo con tiempos de reposo más reducidos, así mismo, el tamaño que presentan estos gránulos es mayor.

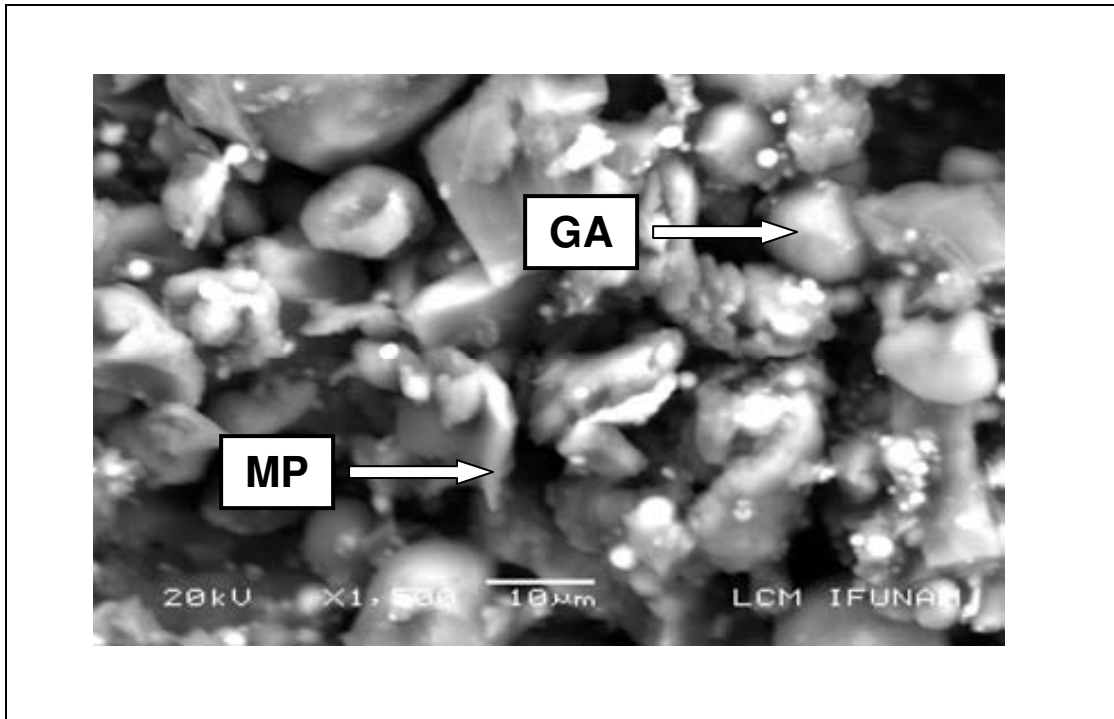


Figura 33. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 7 h de reposo, donde se muestran los gránulos de almidón (GA) y la matriz proteínica (MP).

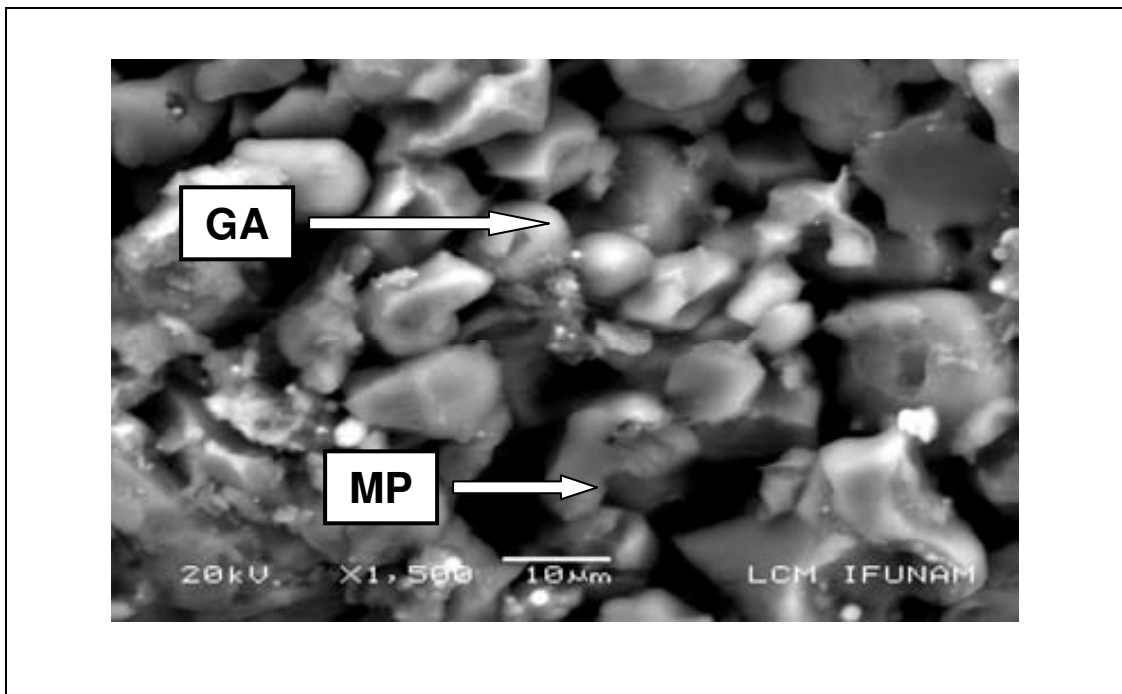


Figura 34. Micrografía del endospermo del maíz QPM H-368 nixtamalizado a 92 °C en 1% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ a 9 h de reposo, donde se observan los gránulos de almidón (GA) y la matriz proteínica (MP).

6.4 Resultados de los objetivos particulares 6 y 7

6.4.1 Contenido de proteína total en el endospermo periférico e interno del grano de maíz nativo y nixtamalizado

Como ya se mencionó en la sección anterior, durante la etapa de cocción y de reposo del proceso de nixtamalización ocurre una difusión simultánea de agua y iones de calcio hacia el interior del grano. Los principales cambios estructurales en el endospermo del grano de maíz nixtamalizado, se presentan en la periferia de esta estructura, que es precisamente donde se detectó una mayor concentración de calcio residual comparado con las capas más internas. Por esta razón, y para simplificar el manejo de los datos, se decidió asociar el 10 % w/w de la primera capa del endospermo (primer raspado) con el siguiente 10 % (segundo raspado) en una sola fracción (20 % w/w en base al peso total del endospermo). Así mismo, se decidió estudiar la relación del grado de fijación del calcio con el contenido de lisina y triptófano en el maíz QPM H-368 nixtamalizado en los tiempos de reposo correspondientes a las 0, 3, 5, 7, 9 y 15 h, por dos razones: en primer lugar, porque en estos tiempos de reposo se detectaron los cambios más significativos en cuanto al contenido de lisina y triptófano en las HMN y, en segundo lugar, porque en la mayoría de los casos y a nivel doméstico, la etapa de reposo no es mayor a 8 horas.

La Figura 35 muestra el contenido de proteína total en las capas externas e internas del endospermo, en donde se observa que en las capas periféricas (20 % w/w del endospermo total) del endospermo del maíz nativo (NC), de la muestra control (CT) y del endospermo del grano de maíz nixtamalizado (EMN), constituidas en su mayoría por endospermo vítreo fue mayor con respecto a las capas internas que corresponden al 80 % del endospermo remanente. Estos resultados están acorde con lo reportado por Duvick (1961). Este autor menciona que el endospermo periférico del grano de maíz, en el cual se incluye a la capa de aleurona, presenta un mayor contenido de proteína con respecto al endospermo interno. Se observó una reducción significativa ($p \leq 0.05$) en el contenido de proteína total en el 20 % del endospermo de la CT y EMN a las 0, 3, 5, 7, 9 y 15 h de reposo con respecto al NC. En el 80 % del endospermo remanente, este componente no se modificó de manera significativa ($p \leq 0.05$) comparado con el grano nativo, excepto en el endospermo correspondiente a las 15 h de reposo.

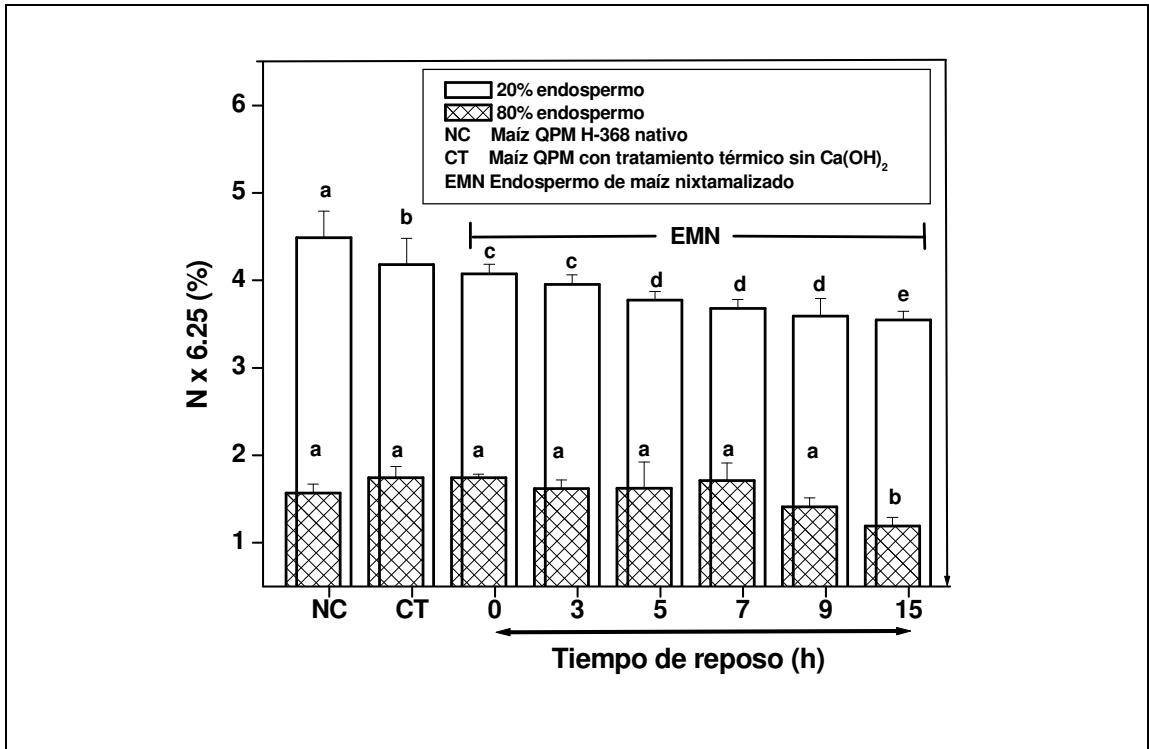


Figura 35. Contenido de proteína en las capas externas (20 % w/w del endospermo total), en las capas internas (80 % remanente) del endospermo del grano nixtamalizado en función del tiempo de reposo, muestra control y grano nativo. Literales diferentes en las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos.

6.4.2 Modificaciones en el contenido de lisina y triptófano en las capas externas e internas del endospermo del grano de maíz nativo y nixtamalizado

En la Figura 36 se presenta el contenido de lisina y triptófano en las capas más externas del endospermo (20 % w/w del endospermo total), así como el contenido de lisina en las capas internas (80 % remanente). En esta figura se muestra que en el endospermo del NC, la lisina se localiza principalmente en las capas externas del endospermo. También se observa que el contenido de lisina en ambas capas disminuye en función del tiempo de reposo en forma lineal (ver Tabla 6). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de lisina entre NC y el CT, así como entre el endospermo del NC y el EMN. Este comportamiento se observó en las capas periféricas y capas internas del endospermo del grano sometido al tratamiento térmico alcalino.

El contenido de triptófano en las capas externas del endospermo (20 % w/w del endospermo total) del grano nativo es de 0.27 %, este valor representa el 23.68 % del

contenido total de este aminoácido en el grano QPM entero, en donde el valor detectado fue de 1.14 %, lo que significa que el 76.32 % remanente se encuentra en el germen del grano. Estos resultados están acorde con Blessin *et al.* (1979) y Nielsen *et al.* (1979), quienes reportaron que el triptófano se encuentra en forma mayoritaria en el germen. El contenido de este aminoácido en el endospermo periférico de la muestra control (CT) es de 0.1 %, lo cual representa una reducción del 62.9 % con respecto al contenido de triptófano en el endospermo del NC. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en el contenido de triptófano entre el endospermo del NC y el CT. En las capas externas e internas del endospermo del grano de maíz nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo, no se detectó la presencia de triptófano.

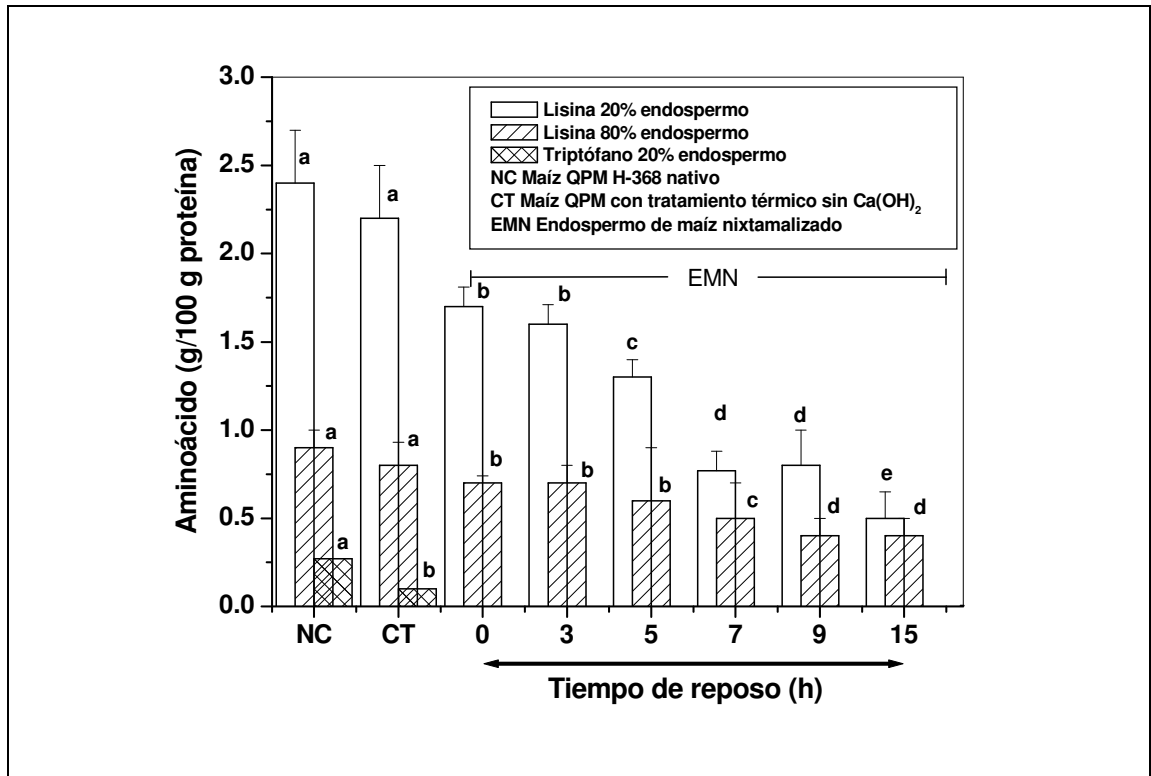


Figura 36. Contenido de lisina y triptófano en las capas externas (20 % w/w del endospermo total), en las capas internas (80 % remanente) del endospermo del grano nixtamalizado en función del tiempo de reposo, muestra control y grano nativo. Literales diferentes en las barras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos.

El mayor contenido de lisina y triptófano en las capas periféricas del endospermo se atribuye a que estas incluyen a la capa de aleurona. La proteína presente en esta estructura muestra un perfil de aminoácidos esenciales (incluyendo a la lisina y triptófano) favorable desde el punto de vista nutricional. Esta proteína es accesible únicamente a las enzimas de los animales monogástricos, cuando las células se rompen mediante procesos como la molienda (Saunders *et al.*, 1969).

6.4.3 Relación entre el contenido de calcio con la digestibilidad de la proteína en el grano de maíz nixtamalizado y relación entre el calcio fijado en el endospermo del grano de maíz nixtamalizado con el contenido de lisina y triptófano

Finalmente, en la Tabla 6 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre el contenido de calcio en el grano de maíz nixtamalizado en forma de harinas con la digestibilidad de la proteína. En esta tabla se puede observar que se detectó una correlación lineal de $r = 0.61$ entre ambas variables, con un nivel de significancia $p \leq 0.05$. Se ha reportado que el procesamiento de las proteínas especialmente a un pH alcalino como lo es el caso del proceso de nixtamalización, determina la formación de enlaces cruzados proteína-proteína, así como la racemización de los aminoácidos de las proteínas, lo que disminuye su digestibilidad y valor biológico (Damodaran, 2000).

Tabla 6. Coeficientes de correlación de Pearson (r) entre las variables analizadas.

Componente	Lisina 20 %	Lisina 80 %	Triptófano 20 %	Lisina HMN	Triptófano HMN	Tiempo de reposo	% Digestibilidad
Ca ²⁺ 20 %	-0.85	-	-	-	-	0.97	-
Ca ²⁺ 80 %	-	-0.87	-	-	-	0.94	-
Ca ²⁺ HMN	-	-	-	0.29	-0.69	0.71	-0.61
Ca ²⁺ endospermo	-	-	-	-	-	0.97	-
Tiempo de reposo	-0.93	-0.90	-	0.67	-0.58	-	0.25

La velocidad de racemización y el número de enlaces cruzados en las proteínas se incrementa cuanto mayor sea el pH y la concentración de iones hidroxilo (Damodaran, 2000). En virtud de que en el germen ocurre una mayor fijación del calcio con respecto al endospermo, habrá una mayor difusión de agua e hidróxido de calcio en esta zona del

grano (Gutiérrez *et al.*, 2007). Por esto, es probable que las proteínas más afectadas en cuanto a su digestibilidad en el maíz nixtamalizado, sean las que se encuentran presentes en el germen.

También en la Tabla 6 se presentan la correlación entre las variables calcio fijado en las HMN y su contenido de lisina y triptófano, así como entre el calcio fijado en las capas externas (20 % w/w del peso total del grano) e internas del endospermo (80 % remanente) y el contenido de lisina y triptófano en ambas capas de esta estructura. En esta tabla se puede observar que los valores de este coeficiente para la relación entre el calcio fijado y el contenido de lisina en las capas externas es de $r = -0.85$; en tanto que la relación entre el calcio fijado y el contenido de lisina en las capas internas del endospermo es de $r = -0.87$. Estos valores indican que el contenido de calcio está relacionado de manera inversa con el contenido de este aminoácido: a mayor calcio fijado en el endospermo menor es el contenido de lisina total en esta estructura. En ambos casos estos valores fueron mayores con respecto a la relación entre el calcio fijado y el contenido de lisina en las HMN ($r = 0.29$).

El valor de r observado para la relación entre el calcio fijado en las HMN y su contenido de triptófano fue de $r = -0.69$. Los coeficientes de correlación negativos sugieren por una parte, que el calcio pudiera incrementar la solubilidad de las proteínas presentes en el endospermo del maíz abundantes en lisina y triptófano (albúminas y globulinas) y por otro lado, que el calcio favorece la formación de péptidos en donde la lisina se encuentra involucrada; en ambos casos la lisina se elimina en el líquido de cocción, reduciéndose así el contenido de este aminoácido en el grano nixtamalizado. Por otra parte, no se detectó una correlación entre el calcio fijado en el endospermo y el contenido de triptófano en esta estructura del grano procesado. Estos resultados indican que el triptófano del endospermo resultó mayormente afectado comparado con la lisina, probablemente debido a que la presencia de este aminoácido se limita en su mayoría al germen del grano tal como fue reportado con anterioridad (Esen *et al.*, 1985). Si se realizara una análisis de la correlación entre el contenido de este aminoácido en esta estructura del grano nixtamalizado con su contenido de calcio residual, probablemente el valor r sería mayor al reportado en este trabajo.

Se propone que la relación entre el calcio y los aminoácidos lisina y triptófano presentes en el endospermo del grano nixtamalizado pudieran atribuirse a las interacciones entre el calcio con átomos altamente electronegativos como por ejemplo, el nitrógeno del grupo ϵ -NH₂ adicional de la lisina y del grupo NH del triptófano los cuales se

comportarían como ligandos del ión Ca^{2+} . A este respecto, se ha reportado que las interacciones Ca^{2+} -proteína muy probablemente ocurren a través de los residuos terminales del ácido glutámico de las proteínas, a través de los dos átomos de oxígeno pertenecientes a los grupos carboxilato presentes en este aminoácido, el cual opera como ancla, alrededor del cual se localizan los demás ligandos: dos de ellos constituidos por átomos de oxígeno pertenecientes a las cadenas laterales de los aminoácidos asparagina y ácido aspártico, otros dos corresponden a átomos de oxígeno presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos que constituyen la cadena principal de la proteína y un átomo de oxígeno adicional, correspondiente a una molécula de agua, considerando que las interacciones calcio-proteína se favorecen en un medio acuoso. En virtud de lo anterior, se ha considerado que los sitios de unión calcio-proteína adquieren una geometría pentagonal bipyramidal (Yang, *et al.*, 2002).

**CONCLUSIONES
Y
RECOMENDACIONES**

7. CONCLUSIONES

El contenido de humedad en el grano de maíz QPM H-368 y la concentración de calcio en su pericarpio, fueron los parámetros cuantitativos para definir la etapa de cocción en el proceso de nixtamalización. Así mismo, se obtuvieron las historias térmicas del grano de maíz objeto de estudio durante el tratamiento térmico al que fue sometido, con lo que se evidenció el control de la temperatura durante el proceso. Este, es un punto determinante para estandarizar el proceso de nixtamalización y delimitar el efecto de las variables estudiadas.

La digestibilidad *in vitro* de la proteína y el contenido de lisina y triptófano en el grano de maíz nixtamalizado total, se modificaron en forma no lineal en función del tiempo de reposo.

La digestibilidad no se modificó en la primera hora de reposo, sin embargo, disminuyó en un 4 % entre las 3 y 9 h y se redujo en un 2 % entre las 11 y 15 h. El contenido de lisina fue aún más inconsistente, con un ligero aumento en la primera hora, el cual descendió al nivel inicial después de 3 h y se redujo hasta en un 50 % en 5 h, para adquirir nuevamente los valores iniciales a partir de las 9 h. El contenido de triptófano en el grano nixtamalizado tuvo un comportamiento análogo al de la lisina. La concentración de triptófano se mantuvo constante durante 3 h de reposo, disminuyó al valor mínimo a las 5 h y aumentó después de 7h, sin llegar a alcanzar los valores iniciales. Estas variaciones podrían explicar las discrepancias reportadas en diversos estudios previos, con relación a las modificaciones que experimenta la calidad de la proteína en el maíz nixtamalizado. Estas diferencias se deben probablemente, a que las investigaciones se realizaron con maíz nixtamalizado a diferentes tiempos de reposo.

La difusión de calcio al interior del grano de maíz durante el proceso de nixtamalización no es un proceso lineal, debido a la morfología del grano. Éste debe considerarse como un sistema multicapa con propiedades fisicoquímicas diferentes en sus estructuras. Por esto, en las primeras 3 h de reposo el calcio se difunde en el pericarpio y su concentración en el grano va en aumento, hasta que la difusión de este ión alcanza el endospermo y el germen, como resultado del daño producido al pericarpio. Posteriormente, el contenido de calcio aumenta entre las 11 y 15 h, debido a su fijación en las capas internas del endospermo y del germen.

En este trabajo se muestra por primera vez, que las modificaciones en las transiciones de fase asociadas al fenómeno de gelatinización del almidón en el

endospermo del grano nixtamalizado, son más evidentes en las capas externas de esta estructura, donde la fijación del calcio también es mayor. Por consiguiente, el concepto actual del proceso de nixtamalización debe modificarse y redefinirse como: *la nixtamalización es el tratamiento térmico alcalino del grano de maíz, el cual produce la gelatinización total de los gránulos de almidón de las capas externas del endospermo del grano y una gelatinización parcial del almidón de las capas internas.*

En el grano nixtamalizado, considerado como un sistema estratificado, el contenido de lisina se reduce significativamente en las capas periféricas del endospermo en función del tiempo de reposo. Por otra parte, este aminoácido no se pierde en la misma proporción en las capas internas del endospermo, en donde el contenido de calcio fijado es significativamente menor con respecto a las capas periféricas de esta estructura. En cuanto al triptófano, el tratamiento térmico alcalino lo elimina por completo del endospermo del grano. Estudios preliminares sugieren que la presencia de este aminoácido en el grano total y no en el endospermo, se debe a que el triptófano se localiza principalmente en el germen del grano, en donde se ha reportado mayor concentración de calcio fijado comparado con el endospermo. Por lo anterior, se plantea la posibilidad de que en el germen se pueda detectar una correlación entre la concentración de triptófano con el calcio fijado en esta estructura

En las primeras 2 h de reposo del grano, la digestibilidad de la proteína del maíz se incrementa y después de este periodo, es similar a la del maíz nativo o sin procesar, lo cual indica que la digestibilidad de la proteína del maíz se mejora por efecto del tratamiento térmico y no debido a la presencia de hidróxido de calcio, el cual está relacionado con el aumento de la cantidad de calcio fijado en el grano.

Los niveles de los aminoácidos lisina y triptófano, disminuyeron durante el proceso de nixtamalización. Sin embargo, se considera que la concentración de estos aminoácidos en las variedades de maíz QPM es suficientemente elevada como para conservarse en un buen nivel, aún después de someter al grano a un tratamiento térmico alcalino.

Finalmente, los resultados derivados de este trabajo muestran que el proceso de nixtamalización no mejorara la calidad nutricia de la proteína, sino más bien, permite el desarrollo de algunas propiedades (reológicas, texturales, organolépticas, etc.) en los productos finales e incrementa su aporte de calcio.

8. PERSPECTIVAS

8.1 Efectuar evaluaciones de las modificaciones en la calidad proteínica del grano de maíz nixtamalizado en forma estratificada, es decir, en el germen del grano, a fin de conocer el efecto del calcio en la biodisponibilidad de las proteínas del maíz procesado.

8.2 Realizar estudios correspondientes a las posibles interacciones químicas del calcio con los componentes del maíz, a través de técnicas como el análisis por espectroscopía de infrarrojo, espectrometría de inducción de plasma y espectrometría de masas con el propósito de conocer las formas en que el calcio se encuentra ligado con cada uno de los compuestos presentes en el grano de maíz.

8.3 Explorar nuevas técnicas como la de fotoacústica diferencial y calorimetría diferencial de barrido con fase modulada para el estudio de la difusión de agua y calcio en las diferentes estructuras del grano nixtamalizado, con la finalidad de conocer su efecto en las modificaciones estructurales y de transiciones de fase que experimentan los componentes químicos del grano.

8.4 Elaborar modelos matemáticos para el mecanismo de la difusión de agua y calcio en el grano de maíz a diferentes condiciones de proceso, para explicar el fenómeno de transferencia de agua y calcio en el grano, a fin de poder establecer diferentes niveles en las variables del proceso que puedan ser empleadas en el diseño de nuevas tecnologías para la nixtamalización del maíz de una manera más eficiente.

REFERENCIAS

9. REFERENCIAS

- AACC. (2000). Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed. Métodos 08-01, 30-25 y 46-13. The Association: St. Paul, MN.
- Abe, M., Arai, S., Kato, H., and Fujimaki, M. (1981). Electrophoretical analysis of zein and isolation of its components. *Agric. Biol. Chem.* **45**:1467-1472.
- Almeida-Domínguez, H.D., Ordoñez-Durán, G.G., and Almeida, N.G. (1998). Influence of kernel damage on corn nutrient composition, dry matter losses and processability during alkaline cooking. *Cereal Chem.* **75**(1): 124-128.
- Amaya-Guerra, C., Serna-Saldívar, S.O., Alanis-Guzmán, M. G. (2006). Soybean fortification and enrichment of regular and quality protein maize tortillas affects brain development and maze performance of rats. *British J. of Nutrition.* **96**(1):161-168.
- Armstrong, C.L., Spencer, T.M., Stephens, M.A., and Brown, S.M. (2000). Transgenic maize. Cap. 6. En: Transgenic Cereals. O'Brien, L. and Henry, R.J. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA. 115-152.
- Asche, G. L., Crenshaw, J. D., Reer, E.R. (1986). Effect of dry, high moisture and reconstituted normal and high-lysine corn diets and particle size on energy and nitrogen metabolism in growing swine. *J. Animal Sci.* **63**(1): 131-138.
- Atwell, W.A., Hood, L.F., Lineback, D.R., Varriano-Marston, E., and Zobel, H.F. (1988). The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. *Cereal Foods World.* **33**: 306-311.
- AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th Ed. Métodos 920.86 y 925.10. The Association: Gaithersburg, MD.
- Appu Rao, A.G. and Narasinga Rao, M.S. (1976). Binding of Ca(II), Mg(II), and Zn(II) by 7S fraction of soybean proteins. *J. Agric. Food Chem.* **24**(3): 490-494.

Barros, C. (2007). Hablemos claro. <http://www.jornada.unam.mx>.

Bedolla, S., de Palacios, M.G., Rooney, L.W., Diehl, K.C. and Khan, M.N. (1983). Cooking characteristics of sorghum and corn for tortilla preparation by several cooking methods. *Cereal Chem.* **60**: 263-268.

Bello-Pérez, L.A., Osorio, D. P., Agama, A. E., Núñez, S.C., Paredes, L. O. (2002). Propiedades químicas, fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado. *Agrociencia.* **36**(3): 319-328.

Bhatty, R.S. and Wu, K.W. (1975). Lysine screening in barley with a modified dye-binding method. *Can. J. Plant Sci.* **55**: 685.

Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. and Tarvin, T.L. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography.* **336**: 93-104.

Biswas, A., Sesa, J., Lawton, J., Gordon, S., Willett, J. (2005). Microwave-assisted rapid modification of zein by octenyl succinic anhydride. *Cereal Chem.* **82**(1):1-3.

Bjarnason, M. and Palmer, W. G. (1972). The maize germ: its role as a contributing factor to protein quantity and quality. *Z. Pflanzenzücht.* **68**:83-89.

Blessin, C.W., Deathrage, W.L., Cavins, J.F., Garcia, W.J., and Inglett, G.E. (1979). Preparation and properties of defatted flours from dry-milled yellow, white, and high-lysine corn germ. *Cereal Chem.* **56**:105-109.

Boctor, A. M. and Harper, A. E. (1968). Measurement of available lysine in heated and unheated foodstuffs by chemical and biological methods. *J. Nutr.* **94**: 289.

Bressani, R. y Scrimshaw, N.S. (1958). Effect of lime treatment on *in vitro* availability of essential amino acids and solubility of protein fractions in corn. *J. Agric. Food Chem.* **6**: 770-774.

Bressani, R., Paz y Paz, R. and Scrimshaw, N.S. (1958). Corn nutrient losses. Chemical changes in corn during preparation of tortillas. *J. Agr. Food Chem.* **6**(10): 770-774.

Bressani, R., Elías, L.G. y Braham, J. E. (1968). Suplementación con aminoácidos del maíz y de la tortilla. *Arch. Lat. Amer. Nutr.* **18**: 123-130.

Bressani, R. (1975). Proteins in Maize. Cap. 2. En: High Protein Quality Maize. Dowden, Hutchinson and Ross (Eds.). Stroudsburg, NJ. 38-57.

Bressani, R. (1990). Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Res. Int.* **6**: 225-264.

Bressani, R., Benavides, B., Acevedo, E., Ortíz, M.A. (1990). Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during rural tortilla preparation. *Cereal Chem.* **67**(6): 515-518.

Bressani, R. (1992). Nutritional value of high-lysine maize in humans. En: Quality Protein Maize. E. Mertz, Ed. The American Association of Cereal Chemists Inc.: St. Paul, MN. USA. 205-225.

Bressani, R. (1995). Quality Protein Maize. En: Proceedings of the International Symposium on Quality Protein Maize. B. A. Larkins and E. T. Mertz, eds. EMBRAPA/CNPMS, Sete Lagoas, Brazil. pp: 41-63.

Bressani, R. (1997). Nutritional Quality of Nixtamalized Corn Masa Flour. Achievement through fortification with micronutrients. Cap. I. En: Fortification of Corn Masa with Iron and/or other Nutrients- A Literature and Industry Experience Review. SUSTAIN, US. Agency for International Development. Washington, D.C. pp. 4-13.

Bressani, R. and Billeb, A.C. (2001). Características de cocción por nixtamalización de once variedades de maíz. *Arch. Lat. Nut.* **51**(1): 86-94.

Bressani, R., Turcios, J.C., Reyes, L., Mérida, R. (2001). Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central. *Arch. Lat. Nut.* **51**(3): 309-315.

Carpenter, K.J. (1973). Damage to lysine in food processing: Its measurement and its significance. *Nutr. Abst. & Review.* **43**: 423.

Carvajal, M., Moctezuma, G., Espinoza, J., Rojo, F., López-Ridura, S. y López-Cruz, E.A. (2000). Aflatoxins in Mexican tortillas and the effects of lime treatment and digestive enzymes on their mutagenicity. Cap. 5. En: Micotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium. De Foe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J. y Sabino, M. (Eds.) IUAPAC and AOAC International. USA. 133-141.

Chang, Y.H. and Hsu, K.H. (1985). Extent of starch gelatinization during hydrothermal processing of corn in masa production. *Cereal Foods World.* **30**: 545.

Christianson, D.D., Nielsen, H.C., Khoo, U., Wolf, M.J., and Wall, J.S. (1969). Isolation and chemical composition of protein bodies and matrix protein in corn endosperm. *Cereal Chem.* **46**: 372-381.

Chu, N.J., Peillet, P.L. and Nawar, W.W. (1976). Effect of alkali treatment on the formation of lysinoalanine in corn. *J. Agr. Food Chem.* **24**: 1084-1085.

Crabb, J.W., West, K.A., Dodson, W.S. and Hulmes, J.D. (1997). Amino Acid Analysis. Cap. 11. En: Current protocols in protein science. John Wiley and Sons, Inc. Eds. supl. 7.

Cravioto, R.O., Anderson, E.K., Lockhort, E.E., Miranda, F. de P. and Harris, R. S. (1945). Nutritive value of the Mexican tortilla. *Science.* **102**: 91-93.

Csonka, F.A. and Jones, B.D. (1927). Studies on Glutelins. I. The α - and β - glutelins of wheat (*Triticum vulgare*). *J. of Biol. Chem.* **73**(1): 321-329.

Daniel, W. (1998). Regresión y Correlación múltiple. Cap. 8. En: Bioestadística. Ed. Limusa, México. D.F. 585-588.

Damodaran, S. (2000). Aminoácidos, péptidos y proteínas. Cap. 6. En: Química de los alimentos. O.R. Fennema, Eds. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 471-497.

Darrah, L.L., McMullen, M.D. Zuber, M.S. (2003). Breeding, Genetics, and Seed Corn Production. Cap. 2. En: Corn: Chemistry and Technology. White, P.J. and Johnson, L. A. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA. pp. 40-42.

De Arreola, M.C., de Porres, E., de Cabrera, S., de Zepeda, M. and Rolz, C. (1988). Aflatoxin fate during alkaline cooking of corn for tortilla preparation. *J. Agr. Food. Chem.* **36**: 530-533.

De Chávez, M.M., Hernández, M. y Roldán, J.A. (1992). Valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en México. 2a. Ed. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. México, D.F. pp. 75-89.

De Groot, A.P. and Slump, D. (1969). Effects of severe alkali treatment of proteins on amino acid composition and nutritive value. *J. Nutr.* **98**: 45-51.

Duvick, D.N. (1961). Protein granules in maize endosperm cells. *Cereal Chem.* **38**: 374-385.

Esen, A., Bietz, J. A., Paulis, J.W., and Wall, J.S. (1985). Isolation and characterization of methionine-rich protein from maize endosperm. *J. Cereal Sci.* **3**:143-152.

FAO/OMSD/UNU. (1985). Necesidades de energía y de proteínas. Informe de una Reunión Consultiva de Expertos. Serie de Informes Técnicos 724. Ginebra, OMS.

FAO/OMS. (1991). Recent developments in protein quality evaluation. Food, Nutrition and Agriculture. Expert Consultation on Protein Quality Evaluation 2/3. Bethesda, Maryland, USA.

FAO. (1993). Introducción. Cap. 1. Modificaciones físicas y químicas del maíz durante su procesamiento. Cap. 5. En: El maíz en la nutrición humana. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 27-30.

FAO. (2006). Statistical database. Página electrónica: <http://apps.fao.org>.

Farnham, D.E., Benson, G.O., Pearce, D.E. (2003). Corn Perspective and Culture. Cap. 1. En: Corn: Chemistry and Technology. White, P.J. and Johnson, L. A. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA. 3-4.

Fernández- Muñoz, J.L., Rodríguez, M.E., Pless, R. C., Martínez-Flores, H. E., Leal, M., Martínez, J.L. and Baños, L. (2002). Changes in nixtamalized corn flour dependent on post cooking steeping time. *Cereal Chem.* **79**(1): 162-166.

Fernández-Muñoz, J.L., Rojas-Molina, J.I., González-Dávalos, M.L., Leal, M., Valtierra, M.E., San Martín-Martínez E. and Rodríguez, M.E. (2004). Study of calcium ion diffusion in components of maize kernels during traditional nixtamalization process. *Cereal Chem.* **81**(1): 65-69.

Flores, F.R., Martínez, B.F., Salinas, M.Y., Chang, Y.K., González, H.J., Ríos, E. (2000). Physicochemical and rheological characteristics of commercial nixtamalised Mexican maize flours for tortillas. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 657-664.

Galván-Ruíz, M., Baños, L. and Rodríguez-García, M.E. (2007). Lime characterization as a food additive. *Sensing and Instrumentation Food Quality and Safety.* **1** (4): 169-175.

Gérard, C., Planchot, V., Colonna, P. and Bertoft, E. (2000). Relationship between branching density and crystalline structure of A- and B-type maize mutant starches. *Carbohydrate Research.* **326**: 130-144.

Gibbon, B. C., Wang, W., and Larkins, B. A. (2003). Altered starch structure is associated with endosperm modification in Quality Protein Maize. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **100**:15329-15334.

Glover, D.V. (1992). Corn protein-genetics, breeding, and value in foods and feeds. En: Quality Protein Maize. E.T. Mertz. Ed. Am. Assoc. Cereal Chem. MN. USA. 9-26.

Gómez, M.H., Rooney, L.W., Waniska, R.D. and Pflugfelder, R.L. (1987). Dry corn masa flour for tortilla and snack foods. *Cereal Foods World*. **32**: 372-377.

Gómez, M.H., McDonough, C.M., Rooney, L.W., and Waniska, R.D. (1989). Changes in corn and sorghum during nixtamalization and tortilla baking. *J. Food Sci.* **54**(2): 330-336.

Gómez, M.H., Waniska, R.D., and Rooney, L.W. (1991). Starch characterization of nixtamalized corn flour. *Cereal Chem.* **68**(6): 578-582.

Gómez, M.H., Lee, J.K., McDonough, C.M., Waniska, R.D. and Rooney, L.W. (1992). Corn starch changes during tortilla and tortilla chip processing. *Cereal Chem.* **69**(3):275-279.

Gómez, A.C., Martínez, F., Figueroa, J.D., Ordorica, C.A. y González, J. (1996). Cambios en algunos componentes químicos y nutricionales durante la preparación de tortillas de maíz elaboradas con harinas instantáneas obtenidas por extrusión continua. *Arch. Lat. Nut.* **46**: 458-467.

González, R., Reguera, E., Figueroa, J. M., y Sánchez-Sinencio, F. (2004). On the nature of the Ca binding to the hull of nixtamalized corn grains. *Food Sci. and Technology*. **10**: 1016-1020.

Gutiérrez, C. E. (2006). Cambios físicos en pericarpio de maíz durante la nixtamalización y su influencia en la cinética de difusión de calcio. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría. México. 48-94

Gutiérrez, E., Rojas-Molina, I., Pons-Hernández, J.L., Guzmán, H., Aguas-Angel, B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios-Fonseca, A., Herrera, G. and Rodríguez, M.E. (2007). Study of calcium ion diffusion in nixtamalized quality protein maize as a function of cooking temperature. *Cereal Chem.* **84**(2): 186-194.

Helm, J.L., and Zuber, M. S. (1969). Pericarp thickness of dent corn inbred lines. *Crop Sci.* **9**: 803-804.

Hinton, J. J. C. (1953). The distribution of protein in the maize kernel in comparison with that of wheat. *Cereal Chem.* **30**: 441-445.

Hoseney, R.C. (1992). Estructura del maíz. Cap 1. En: Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 32-76.

Hsu, H.W., Vavak, D.L., Satterlee, L.D. and Miller, G.A. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J. of Food Science.* **42**(5): 1269-1273.

Hurrell, R.F., Lerman, P., and Carpenter, K.J. (1979). Reactive lysine in foodstuffs as measured by a rapid dye-binding procedure. *J. Food Sci.* **44**: 1221-1227.

Hurrell, R.F. and Carpenter, K.J. (1975). The use of three dye-binding procedures for the assessment of heat damage to food proteins. *Brit. J. Nutr.* **33**: 101.

Hurtado-Castañeda, D., Fernández, J., Gutiérrez, E., Rojas-Molina, I., Fernández-Muñoz, J.L. and Rodríguez, M.E. (2005). The diffusion of calcium ion into the organic layers studied by a differential photoacoustic system. *J. Phys. IV.* **125**: 833-836.

Illescas, R. (1943). La teoría química de la formación del nixtamal. *Sociedad Mexicana de Historia Natural.* **4**: 129-132.

Imberty, A., Chanzy, H., Perez, S., Burleon, A., and Tran, V. (1988). The double helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Mol. Biol.* **201**: 365-378.

Jackson, D.S., Rooney, L.W., Kunze, O.P. and Waniska, R.D. (1988). Alkaline processing properties of stress-cracked and broken corn (*Zea mays* L). *Cereal Chem.* **65**:133-137.

Johnson, L.A. (1991). Corn: The major cereal of the Americas. Cap. 3. En: Handbook of Cereal Sci. Technol. Klaus, J. L. and Karel, K. Eds. Marcel Dekker Inc. N.Y. 31-45.

Katz, S.H., Hediger, L.M., Valleroy, L.A. (1974). Traditional maize processing techniques in the new world. *Science*. **184** (13): 765-773.

Kies, C., Williams, E.R. y Fox, H.M. (1965). Determination of first limiting nitrogenous factor in corn protein for nitrogen retention in human adults. *J. Nutr.* **86** (4): 250-257.

Kroll, R.D. (1984). Effect of pH on the binding of calcium ions by soybean proteins. *Cereal Chem.* **61**(6):490-495.

Krueger, B.R., Knutson, C.A., Inglett, G. E., and Walker, C. E. (1987). A differential scanning calorimetry study on the effect of annealing on gelatinization behavior of corn starch. *J. Food Sci.* **52**: 715–718.

Kyle, D.J. and Styles, E.D. (1977). Development of aleurona and sub-aleurone cells in maize. *Planta* **137**: 185-193.

Landry, J., and Moureaux, T. (1970). Hétérogénéité des glutélines du grain de maïs : extraction sélective et composition en acides amines des trois fractions isolées. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **52**(10): 1021-1037.

Landry, J., Delhaye, S., and Damerval, C. (2000). Improved method for isolating and quantitating α -amino nitrogen as nonprotein, true protein, salt-soluble proteins, zeins and true glutelins in maize endosperm. *Cereal Chem.* **77**(5): 620-626.

Lawton, J. W. and Wilson, C. M. (2003). Proteins of the kernel. Cap. 9. En: Corn: Chemistry and Technology. White, P. J. and Johnson, L. A. Eds. 2nd Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, USA. 313-341.

Logan, D.C., Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Hill, S. A. and Leaver, C. J. (2001). Mitochondrial biogenesis during germination of maize embryos. *Plant Physiol.* **125**: 662-672.

López, A. M., Takasaki, K., Bostwick, D. E., Helentjaris, T. y Larkins, B. A. (1995). Identification of two opaque-2 modifier loci in quality protein maize. *Mol. Gen. Genet.* **247**: 603-613.

Lutz, W. and Goujon, A. (2001). The end of world population growth. *Nature.* **412**: 543-545.

Martínez-Bustos, F., Morales, S. E., Chang, Y. K., Herrera-Gómez, A., Martínez, J. J., Baños, L., Rodríguez, M. E., and Flores, M. H. (1999). Effect of infrared baking on wheat flour tortilla characteristics. *Cereal Chem.* **76**: 491-495.

Martínez-Bustos, F., Martínez-Flores, H.E., San Martín-Martínez, E. Sánchez-Sinencio, F., Chang, Y. K., Barrera-Arellano, D., Rios, E. (2001). Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the tradicional nixtamalisation process. *J. of Sci. Food and Agr.* **81**(15): 1455-1462.

Méndez-Albores, J.A., Arámbula-Villa, G., Moreno-Martínez, E., González-Hernández, J., Loarca-Piña, M.G. and Castaño-Tostado, E. (2004). Aflatoxins fate during the nixtamalization of contaminated maize by two tortilla-making processes. *J. of Stored Products Research.* **40** (1): 87-94.

Méndez-Montalvo, G., Solorza, F.J., Vázquez. V. M., Gómez, M. N., Paredes, L. O., Bello, P. L.A. (2005). Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades cultivadas en México. *Agrociencia.* **39**(3): 267-274.

Mertz, E.T., Bates, L.S., y Nelson, O.E. (1964). Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content of maize endosperm. *Science.* **145**: 279-280.

Morad, M.M., Iskander, F.Y., Rooney, L.W. and Earp, C.F. (1986). Physico-chemical properties of alkaline-cooked corn using traditional and pre-soaking procedures. *Cereal Chem.* **63**: 255-259.

Motto, M., Hartings, H., Maddaloni, M., Lohmer, S., Salamini, F., Thompson, R. (1996).

Genetic manipulations of protein quality in maize grain. *Field Crops Research*. **45**: 37-48.

Nielsen, H.C., Wall, J.S., and Inglett, G.E., (1979). Flour containing protein and fiber made from wet-milled corn germ, with potential food use. *Cereal Chem.* **56**:144-146.

NMX-FF-034/1-SCFI. (2002). Productos alimenticios, no industrializados para consumo humano-Cereales- Parte I: Maíz blanco para proceso alcalino para tortillas de maíz.

Ohta, T., and Nakai, T. (1979). Reaction of cystine and tryptophan under the conditions of acid hydrolysis of proteins: Mechanism of action of cystine. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2419-2423.

Ortega, E. L., Villegas, E. and Vassal, S.K. (1986). A comparative study of protein changes in normal and quality protein maize during tortilla making. *Cereal Chem.* **63**: 446-451.

Osborne, T.B. and Mendel, B. (1914). Nutritive properties of the maize kernel. *J. Biol. Chem.* **18**: 1-16.

Paiva, E., Kriz, A.L., Peixoto, M.J., Wallace, J.C. y Larkins, B.A. (1991). Quantitation and distribution of γ -zein in the endosperm of maize kernels. *Cereal Chem.* **68**: 276-279.

Paredes-López, O. and Mora, R.M. (1983). Influence of storage on the quality of maize meal for tortilla making. *J. Food Technol.* **18**: 53-57

Paredes-López, O. and Saharopulos, M. E. (1982). Scanning electron microscopy studies of lime corn kernels for tortilla making. *J. Food. Tech.* **17**: 687-693.

Paredes-López, O. and Saharopulos-Paredes, M. E. (1983). Maize- A review of tortilla production technology. *Bakers Digest.* **13**: 16-25.

Paredes-López, O., Serna-Saldívar, S.O. y Guzmán-Maldonado, S. H. (2000). El maíz. Cap. II. La nixtamalización y la producción de tortilla. Cap. IV. En: Los Alimentos Mágicos

de las Culturas Indígenas de México-El Caso de la Tortilla. El Colegio de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa. México. 22-23.

Pellet, P.L. and Young, V. R. (1980). Ensayos químicos y microbiológicos de calidad proteínica y Evaluación de la calidad proteínica en animales experimentales. *Alimentos y Nutrición (Boletín)*. Supp. No. **4**.

Pflugfelder, R.I., Rooney L.W. and Waniska, R.D. (1988a). Fractionation and composition of commercial corn masa. *Cereal Chem.* **65**: 262-266.

Pflugfelder, R.I., Rooney L.W. and Waniska, R.D. (1988b). Dry matter losses in commercial corn masa production. *Cereal Chem.* **65**:127-132.

Prasanna, B.M., Vasal, S.K., Kassahun, B. and Singh, N.N. (2001). Quality Protein maize. *Current Sci.* **81**(10): 1308-1319.

Qi, X., Tester, R.F., Snape, C.E. and Ansell, R. (2005). The effect of annealing on structure and gelatinización of maize starches with amylose dosage series. *Progress in Food Biopolymer Res.* **1**: 1-27.

Ramírez, B.T. (2007). La Jornada. Página electrónica: <http://www.jornada.unam.mx>.

Ramos, G., Pezet-Valdez, M., O'Connor-Sánchez, A., Placencia, C. y Pless, R. C. (2004). Hydration rates for various types of Mexican maize based on single-kernel measurements. *Cereal Chem.* **81**(3):308-313.

Robles, R.R., Murray E.D. and Paredes-López, O. (1988). Physico chemical changes in maize starch during the lime-heat treatment for tortilla making. *Intl. J. Food Sci. and Tech.* **23**: 91-98.

Robutti, J.L., Hosney, R.C., and Deyoe, C.W. (1974). Modified opaque-2 corn endosperms. I. Protein distribution and aminoacid composition. *Cereal Chem.* **51**: 163-172.

Rodríguez, M.E., Yáñez-Limón, J.M., Alvarado-Gil, J.J., Vargas, H., Sánchez-Sinencio, F., Figueroa, J.D.C., Martínez, B.F., González-Hernández, J., Silva, M. D. y Miranda, L.C.M. (1996). Influence of the structural changes during alkaline cooking on the thermal, rheological and dielectric properties of maize tortillas. *Cereal Chem.* **73**(5): 593-600.

Rojas-Molina, I., Gutiérrez-Cortez, E., Palacios-Fonseca, A., Baños, L., Pons-Hernández, J.L., Guzmán, H., Pineda-Gómez, P. and Rodríguez, M.E. (2007). Study of the structural and thermal changes in the endosperm of Quality Protein Maize during traditional nixtamalization process. *Cereal Chem.* **84**(4): 304-312.

Rojas-Molina, I., Gutiérrez, E., Cortés-Acevedo, M.E., Falcón, A., Bressani, R., Rojas, A., Ibarra, C., Pons-Hernández, J.L., Guzmán-Maldonado, S.H., Cornejo-Villegas, A. and Rodríguez, M.E. (2008). Analysis of quality protein changes in nixtamalized QPM flours as a function of the steeping time. *Cereal Chem.* **85**(3): 409-416.

Sahai, D., and Jackson, D.S. (1999). Enthalpic transitions in native starch granules. *Cereal Chem.* **76**: 444-448.

Sahai, D., Mua, J. P., Surjewan, I., Buendia, M. O., Rowe, M., and Jackson, D. S. (1999). Assessing degree of cook during corn nixtamalization: Impact of processing variables. *Cereal Chem.* **76** (6): 850-854.

Sahai, E., Surjewan, I., Mua, J.P., Buendia, M. O., Rowe, M. and Jackson, D.S. (2000). Dry matter loss during nixtamalization of a white corn hybrid: Impact of processing parameters. *Cereal Chem.* **77**(2): 254-258.

Saldana, G. and Brown, H.E. (1984). Nutritional composition of corn and flour tortillas. *J. Food Sci.* **49**:1202-1203, 1205.

Sanderson, J.J., Wall, S., Donaldson, G. L. and Gavine, J.F. (1978). Effect of alkaline processing of corn on its amino acids. *Cereal Chem.* **55**: 204-213.

Sandhu, K. S., Singh, N., and Kaur, M. (2004). Characteristics of the different corn types and their grain fractions: Physicochemical, thermal, morphological, and rheological properties of starches. *J. Food Eng.* **64**:119-127.

Schoch, T. J. and Maywald, E.C. (1956). Microscopic examination of modified starches. *Anal. Chem.* **28**: 382-387.

Saunders, R. M., Walker, H. G., Jr., and Kohler, G.O. (1969). Aleurone cells and the digestibility of wheat millfeeds. *Poult. Sci.* **48**: 1497-1503.

Sefa-Dedeh, S., Cornelius, B., Sakyi, D.E., Ohene, E. (2003). Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize. *Food Chem.* **86**: 317-124.

Serna-Saldívar, S.O., Knabe, D.A., Rooney, L.W., and Tanksley, T.D. Jr. (1987). Effect of lime cooking on energy and protein digestibility of maize and sorghum. *Cereal Chem.* **64**:247-252.

Serna-Saldívar, S.O., Knabe, D.A., Rooney, L.W., Tanksley, T.D. Jr., and Sproule, A.M. (1988a). Nutritional value of sorghum and maize tortillas. *J. Cereal. Sci.* **7**: 83-94.

Serna-Saldivar, S.O., Tellez-Girón, A. and Rooney, L.W. (1988b). Production of tortilla chips from sorghum and maize. *J. Cereal Sci.* **8**: 275-284.

Serna-Sadívar, S.O., Gómez, M.H. and Rooney, L.W. (1990). The chemistry, technology and nutritional value of alkaline cooked corn products. Cap. 4. En: Advances in Cereal Science and Technology. Vol. 10. Ed. Y. Pomeranz. AACC. St. Paul, MN. US. 243-307.

Serna-Saldívar, S. O., Gómez, M. H., Islas-Rubio, A. R., Bockholt, A. J. and Rooney, L. W. (1992). The alkaline processing properties of Quality Protein Maize. En: Quality Protein Maize. E. Mertz, Ed. The American Association of Cereal Chemists Inc.: St. Paul, MN. USA. 273-293.

Serna-Saldívar, S.O. (1996). Morfología y estructura química. Cap. 2. En: Almacenamiento e Industrialización de los cereales. AGT. México. 37.

Serna-Saldívar, S.O. (1997). The Fortification and Enrichment Nutritional Quality of Corn Tortillas: An Industrial Approach. Cap. III. En: Fortification of Corn Masa with Iron and/or other Nutrients- A Literature and Industry Experience Review. SUSTAIN, US. Agency for International Development. Washington, D.C. 4-13.

Shandera, D.L. and Jackson, D.S. (2002). Corn kernel structural integrity: Analysis using solvent and heat treatments. *Cereal Chem.* **79**(2): 308-316.

Steinberg, M., Kim, C.Y. and Schwende, F.T. (1975). Lysinoalanine. Presence in food and food ingredients. *Science* **196**: 992-994.

Sproule, A.M., Saldívar, S.O., Bockholt, A.J., Rooney, L.W. and Knabe, D.A. (1988). Nutritional evaluation of tortillas and tortilla chips from quality protein maize. *Cereal Foods World.* **33**: 233-236.

Swarup, S., Timmermans, M.C.P., Chaudhuri, S., and Messing, J. (1995). Determinants of high-methionine trait in wild and exotic germ-plasm may have escaped selection during early cultivation of maize. *Plant J.* **8**:359-368.

Tortilla Industry Association. 2003. Página Electrónica: <http://www.tortilla-info.com>.

Trejo-González, A., Feria-Morales, A. y Wild-Altamirano, C. (1982). The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla production. Modifications of proteins: Food, nutritional, and pharmacological aspects. En: Advances in Chemistry. Freency, R.E. and Whitaker, J.R. Eds. ACS: Washington, DC. 245-263.

Vanegas, R. (2007). La tecnología hace al maíz más barato. <http://www.eluniversal.com.mx>.

Vasal, S.K. (2001). High quality protein corn. Cap. 8 . En: Specialty Corns. Ed. Hallauer, A.R. CRC Press. Boca Raton, FL. USA. 85-129.

Villegas, E. and Mertz, E.T. (1971). Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT. Research Bulletin. No. 8. 1-14. CIMMYT. México.

Villegas, E., Vasal, S.K. and Bjarnason, M. (1992). Quality protein maize—what is it and how was it developed. En: Quality Protein Maize Mertz, E.T. Eds. Purdue University, West Lafayette, IN. pp. 49-78.

Vivas, N.E., Waniska, R.D. and Rooney, L.W. (1987). Effect of tortilla production on proteins in sorghum and maize. *Cereal Chem.* **64**: 384-389.

Vivas, N.E., Serna-Saldívar, S.O., Waniska, R.D. and Rooney, L.W. (1990). Effect of tortilla chip preparation on the protein fractions of quality protein maize, regular maize and sorghum. *J. Cereal Sci.* **12**: 289-292.

Vivas, N.E., Waniska, R.D. and Rooney, L.W. (1992). Effects on proteins in sorghum, maize, and pearl millet when processed into acidic and basic tô. *Cereal Chem.* **69** (6): 673-676.

Watson, S. A. (1987a). Measurement and maintenance of quality. Cap. 2. En: Corn: Chemistry and Technology. Watson, S.A. and Ramstad, P. E. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA. 125-183.

Watson, S. A. (1987b). Structure and composition. Cap. 1. En: Corn: Chemistry and Technology. Watson, S.A. and Ramstad, P. E. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA. 55-82.

Watson, S. A. (2003). Description, development, structure, and composition of the corn kernel. Cap. 3. En: Corn: Chemistry and Technology. White, P.J. and Johnson, L. A. Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, MN, USA. 69-101.

Weber, C.W., Kohlhepp, E.A., Dooraine, A. J. and Ochoa, L.J. (1993). Nutritional composition of tamales and corn and wheat tortillas. *J. Food Comp. and Anal.* **6**: 324-335.

White, P.J. and Johnson, L.A. (2003). Description, development, structure and composition of the corn kernel. Cap. 3. En: Corn: Chemistry and Technology. 2nd Ed. American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, USA. 69-78.

Wilson, C.M. (1983). Seed protein fractions of maize, sorghum and related cereals. En: Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive Value. E. Gottschalk and H.P. Muller, Eds. M. Nijhoff/Junk, The Hague, Netherlands. 271-307.

Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M., and Rist, C. E. (1952). Structure of the mature corn kernel. II. Microscopic structure of pericarp, seed coat, and hilar layer of dent corn. *Cereal Chem.* **29**: 334-348.

Wolf, M. J., Khoo, U., and Seckinger, H.L. (1969). Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high-lysine maize. *Cereal Chem.* **46**: 253-263.

Wu-Leung, W.T. and Flores, M. (1961). Food composition Table for use in Latin America. INCAP. Guatemala. June. 56-67.

Yamashita, Y., and Tanoue, E. (2003). Distribution and alteration of amino acid in bulk DOM along a transect from bay to oceanic waters. *Marine Chem.* **82** (3-4): 145-160.

Yau, J.C., Bockholt, A.J., Smith, J.D., Rooney, L. W., and Waniska, R.D. (1999). Maize endosperm proteins that contribute to endosperm lysine content. *Cereal Chem.* **76**(5): 668-672.

Yglesias, R., Parkhurst, M.A., and Jackson, D.S. (2005). Development of laboratory techniques to mimic industrial-scale nixtamalization. *Cereal Chem.* **82**(6): 695-701.

Young, V.R., Scrimshaw, N.S., and Pellett, P.L. (1998). Significance of dietary protein

source in human nutrition: animal and/or plant proteins. En: Feeding a world population of more than eight billion people. Waterlow, Eds. Oxford University Press: OX, UK. 205-221.

Zallen, R. (1998). "Amorphous morphology: The geometry and topology of disorder". Cap. 11. En: The physics of amorphous solids. Eds. John Wiley and Sons: N.Y. USA. 33-51.

Zazueta, C. C., Ramos, G., Fernández-Muñoz, J.L., Rodríguez, M.E., Acevedo-Hernández, G. y Pless, R.C. (2002). A radioisotopic study of the entry of calcium ion into the maize kernels during nixtamalization. *Cereal Chem.* **79**(4):500-503.

Zobel, H.F., Young, S.N., and Rocca, L.A. (1988). Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chem.* **65**: 443-446.