



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**CAMBIOS ESTRUCTURALES EN EL ENDOSPERMO
DEL MAÍZ DE CALIDAD PROTEÍNICAS DURANTE
EL PROCESO TRADICIONAL DE NIXTAMALIZACIÓN**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

L. N. ALIN JAEL PALACIOS FONSECA



TUTOR: Dr. MARIO ENRIQUE RODRÍGUEZ GARCIA

2007



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.

*Dedicada a mí hijo
Leonardo Yoel y a
Alfonso por su apoyo a
lo largo de este último
año, y espero de los que
vienen*

.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde realicé mis estudios de maestría.

CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de mi trabajo de tesis a través de la beca y también a CONCyTEQ por su apoyo.

Unidad de Biotecnología, Campo Experimental Bajío, INIFAP, Celaya Guanajuato; por la donación del grano de maíz.

Al Dr. Mario E. Rodríguez por su gran apoyo, su ayuda, paciencia y sobretodo por su invaluable generosidad.

A mis Asesores, por sus valiosas sugerencias y el tiempo dedicado a este trabajo que permitieron mejorar este trabajo.

Al M. en C. Roberto Hernández Reyes, técnico académico del Instituto de Física - UNAM, por el tiempo dedicado a este trabajo en la obtención de imágenes de microscopia electrónica de barrido.

A la M. en C. Leticia Baños del instituto de Materiales, por su apoyo y asesoría en las determinaciones de rayos X.

A Posidia Pineda Gómez y Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa por su apoyo en las determinaciones de calorimetría diferencia de barrido, así como sus valiosas sugerencias en este tema.

Y a todas las personas que me apoyaron y ayudaron de alguna manera en la realización del presente trabajo de tesis. Gracias a todos.

RESUMEN

El maíz (*Zea Mays L*) es uno de los cereales más importantes en la dieta de América Latina, particularmente en México, donde éste es transformado en tortilla a través de un proceso térmico-alkalino, llamado nixtamalización, y durante el cual ocurren cambios estructurales en el grano de maíz. Al respecto, en este trabajo se estudiaron solamente los que ocurren en el endospermo del grano de maíz de una variedad con alta calidad proteínica (QPM H-368) en función del tiempo de reposo (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 h). El endospermo se seccionó del exterior al interior en el 10% de la capa externa, el siguiente 10% y el 80% restante, y se analizaron mediante las técnicas de microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (MEB-BV), difracción de rayos X (DRX), y calorimetría diferencial de barrido (DSC). Es importante mencionar que para material estudiado, el endospermo harinoso constituye el 20.82±1.5% y 79.08±1.4% el endospermo córneo. Las micrografías de MEB-BV mostraron la diferencia de forma y factor de empaquetamiento entre el endospermo harinoso y córneo. Los difractogramas de rayos X mostraron en el endospermo córneo mayor calidad cristalina que en el harinoso, en tanto en las muestras nixtamalizadas los cambios estructurales en el 10% de la capa más externa y el siguiente 10% del endospermo fueron completamente amorfos. Los difractogramas del 80% del endospermo más interno no muestran cambios en la cristalinidad después del proceso de nixtamalización. Estos datos fueron confirmados por los termogramas obtenidos en el DSC de las capas más externas del endospermo, al no exhibir el pico endotérmico característico del almidón (formado entre 64° y 81° C), mientras el pico endotérmico del 80% restante aparece en todos los casos.

De acuerdo a los resultados antes mencionados, se puede establecer una nueva definición del proceso de nixtamalización. Durante el proceso de nixtamalización ocurre una gelatinización total de los gránulos de almidón presentes en las capa más externa e intermedia (20%) del endospermo y una gelatinización parcial de la capa más interna del mismo.

SUMMARY

Corn (*Zea mays* L) is one of the most important grains in the Latin American diet, particularly in México. In México, corn is transformed into tortillas through a process called nixtamalization. During this process structural changes appear taking place to the corn grain. This work shows the study of the structural changes of the endosperm of Quality Protein Maize (QPM H-368C) during the traditional nixtamalization process as a function of steeping time from (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 and, 15). Structural changes were studied in 10% of the outermost layers, next 10% and remaining 80% of the endosperm, by using Scanning Electron Microscopy (SEM-), X-ray diffraction (DRX) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) techniques. In this corn kernel the soft endosperm makes up the 20.82±1.5% and 79.08±1.4% hard endosperm. Scanning Electron Microscopy images revealed that soft and hard endosperm have different shapes and packing factors. The X-ray diffraction patterns of the hard and soft endosperm from raw corn suggests that the hard endosperm has a bigger relative crystallinity quality than the soft endosperm. Samples cooked with and without the Ca(OH)₂ and steeped for different hours, showed structural changes. X-ray diffraction patterns from the outermost 10% layers and subsequent 10% of the endosperm were completely amorphous. Whereas the crystallinity in the internal layers of endosperm (remaining 80%) did not have significant changes after the treatments and exhibited the characteristic patterns of crystalline amylose and amylopectin. Differential Scanning Calorimetry measurements in the outermost layers of the endosperm did not exhibit the characteristic endothermic peak of starch (from 64 to 81°C) compared with the raw sample, while the endotherm peak for 80% of the endosperm internal layers appears in all cases. According to these results, a new definition of the nixtamalization process can be developed as follows. During the nixtamalization process 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.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays L.*) fue la principal fuente alimenticia de las civilizaciones precolombinas en el nuevo mundo, además de moneda y religión de los antiguos mexicanos. Hoy en día como en otros países, su cultura y disponibilidad de alimentos define la base de la dieta; la tortilla de maíz es la protagonista de la dieta típica mexicana y el centro básico de la dieta nacional con 45.7% de consumo. La cual es la principal fuente de calorías, proteínas, fibra y calcio [Urizar-Bressani, 1997; Bressani y col., 2001; Arámbula y col., 2001; Bello y col., 2002]. Las tortillas son elaboradas de maíz mediante un proceso conocido como “Nixtamalización” que consiste en el cocimiento alcalino usando hidróxido de calcio, así como un subsecuente reposo de maíz.

Es conocido que el maíz es deficiente en lisina y triptófano, lo que crea la necesidad del desarrollo de variedades con un mejor balance de aminoácidos, tal es el caso del maíz de calidad proteica, llamado QPM, por sus siglas en inglés. De acuerdo a Bressani y col. (1990) el proceso de nixtamalización en el maíz QPM incrementa el contenido de calcio y la calidad de la proteína suele ser significativamente mayor.

Durante el tratamiento térmico-alcalino se producen cambios fisicoquímicos importantes en las estructuras anatómicas en el grano de maíz (pericarpio, endospermo y germen) que se refleja en las propiedades nutrimentales y sensoriales del producto final [Serna y col., 1990, Bressani y col. 1990, Rodríguez y col. 1996, Sefa-Dedeh y col. 2004]. Un alto porcentaje de estos cambios se debe a modificaciones en el endospermo donde se encuentra localizado el almidón, principal componente químico del maíz, ya que se encuentra en 86-89%. Los cambios estructurales han sido asociados con el hinchamiento de los gránulos de almidón y los procesos hidrotérmicos conocidos como gelatinización, retrogradación y pastificación [Dengate, 1984]. Las características de la superficie de los gránulos de almidón pueden ser determinadas usando microscopia electrónica de barrido. Se han realizado diversos estudios analizando la estructura cristalina del gránulo de almidón. Katz y van Italia (1930), fueron los primeros en realizar estudios de difracción de rayos X para distinguir los dos principales tipos de patrones de la estructura cristalina de los gránulos del almidón. La estructura cristalina del gránulo de almidón ha sido atribuida

directamente a la amilopectina y la parte amorfa es formada esencialmente amilosa [Cameron y Donald, 1993].

Si lo que se quiere es entender y controlar los atributos de textura que se generan en los productos nixtamalizados, es esencial determinar la morfología y los cambios físicos que experimenta el almidón durante el procesamiento térmico alcalino. Adicionalmente, el caso del maíz de calidad proteínica, el cual presenta el doble de lisina y triptófano que los maíces comunes lo que mejora su calidad nutricional, presenta una buena opción para la fabricación de harina de maíz, tortillas y botanas que resulta en un impacto positivo en el estado nutricional de las personas que consumen estos productos.

Es necesario señalar que de acuerdo a la literatura, aún no se tiene un entendimiento completo de los cambios fisicoquímicos y nutrimentales que experimenta el grano de maíz durante el proceso de nixtamalización, aún cuando existen numerosos artículos científicos relacionados con este tema. Los estudios realizados en cambios estructurales por efecto de la difusión de calcio y agua en el grano de maíz durante el proceso térmico-alcalino se han realizado principalmente en el pericarpio y son pocos los estudios en endospermo. No pueden ser comparados, y mucho menos correlacionados, ya que estos datos muestran un nivel de variación muy alto, además es necesario señalar que consideran al endospermo como un sistema homogéneo y no multi-capa [Fernández y col. 2004]. Considerando que el QPM es modificado en el gene Opaco-2 (O_{p2}) que produce el endospermo cristalino (duro o córneo) que es el componente mayoritario del grano de maíz, y por consiguiente, el que va a determinar los requerimientos de cocción, lo que repercute directamente sobre el rendimiento en el proceso y la calidad de la tortilla [Vázquez y Salinas, 1996], pudiendo estos parámetros incrementarse.

En este trabajo se propuso investigar los cambios que ocurren en la mayor estructura anatómica del grano de maíz (endospermo) de una variedad con alta calidad proteínica (QPM H-368) durante el proceso tradicional de nixtamalización como función del tiempo de reposo de 0 a 15 h, a 92° C. El endospermo se fraccionó del exterior al interior en los siguientes porcentajes 10% de la capa externa, el siguiente 10% y el 80% restante.

INDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE	vii
GLOSARIO	x
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS	xii
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 <u>Generalidades de maíz</u>	3
2.1.1 <i>Valor nutritivo del maíz</i>	3
2.1.2 <i>Calidad proteínica del maíz, MPC</i>	4
2.1.2.1 <i>Variedad H-368C</i>	4
2.2 <u>Estructura del grano de maíz</u>	5
2.2.1 <i>Pericarpio</i>	7
2.2.2 <i>Germen</i>	7
2.2.3 <i>Cofia</i>	7
2.2.4 <i>Endospermo</i>	7
2.2.4.1 <i>Proteínas y lípidos del endospermo</i>	9
2.2.4.2 <i>Carbohidratos del endospermo</i>	10
2.2.4.2.1 <i>Carbohidratos simples</i>	10
2.2.4.2.2 <i>Carbohidratos complejos</i>	10
2.3 <u>Biopolímeros derivados del maíz: almidón</u>	10
2.3.1 <i>Gránulo de almidón</i>	11
2.3.1.1 <i>Amilosa</i>	12
2.3.1.2 <i>Amilopectina</i>	13
2.3.2 <i>Clasificación en cuanto a su estructura</i>	15
2.3.3 <i>Propiedades físicas del almidón</i>	17
2.3.4 <i>Modificaciones térmicas del almidón</i>	17
2.3.4.1 <i>Gelatinización</i>	17
2.3.4.2 <i>Gelación (pastificación)</i>	20
2.3.4.3 <i>Retrogradación</i>	20
2.4 <u>Tratamiento térmico-alkalino (cocimiento-reposo)</u>	21

2.4.1	<i>Efectos del proceso térmico-alkalino</i>	23
2.4.2	<i>Efecto de la nixtamalización sobre la biodisponibilidad de nutrientes</i>	24
III	OBJETIVOS	27
3.1	<u>General</u>	27
3.1.1	<i>Específicos</i>	27
	HIPOTESIS	28
IV	METODOLOGIA	29
4.1	<u>Materiales</u>	29
4.1.1	<i>Maíz</i>	29
4.1.2	<i>Almidón, amilosa y amilopectina</i>	29
4.2	<u>Preparación de las muestras</u>	29
4.2.1	<i>Tratamiento térmico-alkalino</i>	29
4.2.2	<i>Historia de cocimiento (perfil de temperatura-tiempo</i>	30
4.2.3	<i>Granos nixtamalizados</i>	31
4.2.4	<i>Separación manual del endospermo</i>	32
4.2.5	<i>Elaboración de harinas</i>	33
4.3	<u>Técnicas experimentales para el análisis de las muestras</u>	33
4.3.1	<i>Caracterización física del grano</i>	33
4.3.2	<i>Microscopia de barrido electrónico al bajo vacío (LV-SEM)</i>	34
4.3.3	<i>Difracción de rayos X (DRX)</i>	35
4.3.3.1	<i>Estructura cristalina de los materiales</i>	37
4.3.3.2	<i>Puntos, planos y direcciones en una celda unitaria</i>	37
4.3.4	<i>Calorímetro diferencial de barrido (DSC)</i>	38
4.4	<u>Análisis estadístico</u>	38
V	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1	<u>Caracterización del grano</u>	39
5.1.1	<i>Peso</i>	39
5.1.2	<i>Determinación dimensional del grano de maíz</i>	39
5.1.3	<i>Distribución de las principales estructuras anatómicas del grano de maíz</i>	40
5.1.4	<i>Dureza del grano</i>	41
5.2	<u>Microscopia electrónico de barrido de bajo vacío en gránulos de almidón</u>	42
5.2.1	<i>Morfología del endospermo H368-C sin tratamiento térmico-alkalino</i>	43
5.2.2	<i>Morfología del endospermo H368-C con tratamiento térmico-alkalino en función del tiempo de reposo</i>	43

5.3	<u>Propiedades estructurales de biopolímeros derivados del maíz: amilosa y amilopectina</u>	58
5.3.1	<i>Estudio de patrones de difracción de rayos X en almidón</i>	58
5.3.2	<i>Estructura cristalina del endospermo sin tratamiento térmico- alcalino</i>	60
5.3.3	<i>Efecto del tratamiento térmico en la estructura cristalina del endospermo</i>	62
5.3.4	<i>Efecto del tratamiento térmico-alcalino en la estructura cristalina del endospermo</i>	62
5.4	<u>Calorimetría diferencial de barrido en el endospermo</u>	69
VI	CONCLUSIONES	77
	REFERENCIAS	79
	APENDICE	84

II. ANTECEDENTES

2. 1. Generalidades de maíz

El término maíz, como se conoce en la actualidad, no es Maya ni Azteca. La palabra Nahuatl es *Centli* y la Maya *Ixim*. Los huastecos denominaban al maíz *tzis*, que significa hormiga. La palabra maíz fue traída del caribe por los españoles en donde habían estado por algunas décadas antes de la conquista de México. Fue Carlos Linneo [1707-1778, citado por Díaz C. H. y Rochin R., 1993], quien le asignó el nombre en latín de *Zea mays*. *Zea* que significa “Causa de la vida” y *mays* deriva de maíz (nuestra madre) término empleado entre Indios Caribeños de Cuba y Haití. Ambos términos, *Zea* y *mays* reflejan la alta estima que el cultivo de maíz tenía en las sociedades precolombinas.

El grano de maíz se emplea en la alimentación animal, para consumo humano y en la industria para obtención de una gran variedad de productos. Como alimento para el hombre, el maíz puede ser aprovechado directamente antes de que llegue a su estado de madurez en la mazorca, ya maduro el grano o cuando está seco. Generalmente el maíz se remoja en agua caliente y se muele para obtener una masa que se usa para elaborar atoles, pozol, pozoles, galletas, entre otras. Hasta hace poco tiempo, el maíz nixtamalizado era procesado a nivel doméstico, hoy el uso de harina de maíz nixtamalizado creció y desplazó el proceso tradicional, por su conveniencia en la preparación de tortillas y toda la amplia gama de antojitos de la cocina mexicana, así como frituras, botanas, tostadas, y otros productos de maíz nixtamalizado, como tamales, burritos y tacos, comienzan a impactar en la exportación desde México y EUA con perspectivas de crecimiento.

En México, el maíz se consume principalmente bajo la forma de tortilla. Los totopos ocupan el segundo lugar como botanas (snacks) nixtamalizadas, después de las papas fritas, en volumen de producción y ventas, con \$4.86 billones de USD en ventas en los EUA en el año 2000 [Campas-Baypoli y col., 2002].

2.1.1. *Valor nutritivo del maíz*

Todos los tipos de maíz que se producen en México tienen una composición bioquímica similar, por lo que su valor alimenticio prácticamente no presenta variaciones

en cuanto a clase o variedad. Una ración de 100 g de maíz blanco suministra 350 calorías, 8.3 g de proteína y 69.6 g de carbohidratos.

EL maíz se caracteriza por su bajo contenido de proteínas, las cuales poseen menor valor nutritivo si se les compara con las de origen animal, lo que se debe a un balance deficiente de los aminoácidos esenciales: lisina y triptófano [Casanueva y col., 2001].

2.1.2. Calidad proteínica del maíz, MPC (Quality Protein Maize QPM)

A principios de los 60's se descubre un mutante de maíz que tenía la característica de presentar el doble de contenido de lisina y triptófano en la proteína del endospermo, al cual se le conocía como opaco 2 [Mertz y col., 1964]. A partir de ese momento creció el entusiasmo por desarrollar híbridos y variedades comerciales con esta característica. En México, el antiguo INIA (ahora INIFAP) desarrolló versiones opacas de los principales híbridos y variedades de maíz comercial, pero en la década de los 70's se acordó suspender el desarrollo de nuevos maíces opacos, debido principalmente al bajo rendimiento que mostraban por efecto del fenotipo harinoso presente en estos, además de que el secado del grano en campo era más lento que los maíces normales, lo que lo hacía más susceptible a las plagas de almacén como los gorgojos y palomillas, era más propenso al ataque de enfermedades de mazorca y grano.

Pocos centros de investigación continuaron con el desarrollo de versiones con el gen opaco pero con fenotipo normal o cristalino. En el CIMMyT se dedicaron a buscar la modificación del endospermo suave a cristalino sin reducir la calidad nutricional, programa desarrollado por la Dra. Evangelina Villegas en lo referente al análisis de la calidad y por el Dr. S. K. Vasal en el mejoramiento genético. Después de 25 años de trabajo interdisciplinario el CIMMyT liberó una serie de líneas y poblaciones con el endospermo modificado, las cuales se les conoce ahora como QPMs [Villegas, 1994].

2.1.2.1. Variedad H-368C

Los híbridos y variedades de maíz QPM liberados y los que se encuentran en desarrollo están diseñados para el mercado de la masa y la tortilla, pues se han considerado las características de calidad que requiere la industria. Sin embargo, debido a la naturaleza

de los genes que determinan tanto la calidad nutricional como la modificación del endospermo, no ha sido posible alcanzar en su totalidad los parámetros requeridos para los estándares del proceso industrial, aunque existen materiales con buen potencial, entre la que esta la variedad *H-368C* (tabla 2.1).

El híbrido de maíz QPM de la variedad H-368C presentan una semejanza a los maíces normales en cuanto a las características de grano en general, lo cual hace posible que puedan ser utilizados ampliamente en el proceso industrial de la masa y la tortilla [Lemus-Flores, 2003].

2.2 Estructura del grano de maíz

El maíz (*Zea mays*) es quizá la planta más domesticada y evolucionada del reino vegetal. Su grano está compuesto de cuatro partes principales: pericarpio, endospermo, germen y capa de aleurona (figura 2.1) [Watson y Ramstad, 1987].

En términos de porcentaje en peso, el grano está constituido de la siguiente manera: pericarpio de 5-6 %, capa de aleurona 2-3%, endospermo 80-85%, germen 10-12% (FAO, 1993).

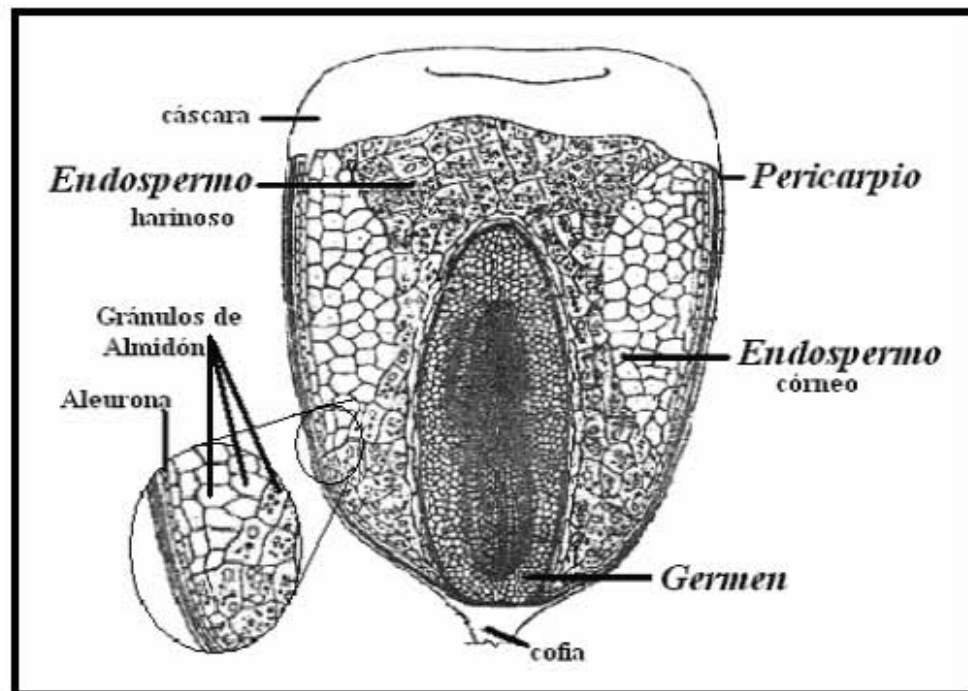


Figura 2.1: Representación esquemática del grano de maíz (corte longitudinal) [Klaus y Karen, 1991].

Tabla 2.1: Características del híbrido H-368C.

Características				Composición	Componentes	Almidón**	Temperatura	Condiciones
Agronómicas **	de calidad tortillera*	del grano*	de calidad proteica* (%)	química** (%)	del grano* (%)	(%)	de Gelatinización **	climáticas de cultivo**
<i>Tipo de material:</i> HS-QPM	<i>Rendimiento</i> <i>Kg Tortilla /</i> <i>Kg Nixtamal</i> :1.6	<i>Reflectancia</i> <i>(Color):</i> 72	Proteína <i>Grano:</i> 9.1 <i>Endospermo:</i> 7.9	<i>Humedad:</i> 8.8 <i>Proteína:</i> 8.8	<i>Pedicelo:</i> 1.2	<i>Total:</i> 83.6	<i>Temperatura</i> <i>(°C):</i> 73.4	<i>Temperatura</i> <i>(°C):</i> 22-24
<i>Área de adaptación:</i> Subtrópico	<i>Precipitación</i> <i>pluvial (mm):</i> 800 a 900		Proteína de endospermo <i>Lisina:</i> 4	<i>Grasa:</i> 4.8 <i>Cenizas:</i> 1.1	<i>Pericarpio:</i> 5.3	<i>Disponible:</i> 70.4	<i>Entalpía:</i> <i>(J g⁻¹):</i> 4.2	<i>Peso</i> <i>Hectolítrico</i> <i>(Kg/hL):</i> 74.3
<i>Tipo de grano:</i> Semicristalino			<i>Triptófano:</i> 0.7	<i>Fibra dietaria:</i> 7.66 <i>Carbohidratos:</i> 77.69	<i>Germen:</i> 12.5 <i>Endospermo:</i> 81	<i>Resistente:</i> 2		<i>Índice</i> <i>de flotación:</i> 45 (intermedio)

* Vázquez y col., 2003

** Méndez-Montealvo y col., 2005

2.2.1 Pericarpio

El pericarpio, como lo muestra la figura 2.1, es la parte más externa de la estructura anatómica del grano de maíz y cubre por completo al endospermo y al germen. Es una estructura muy delgada, constituida por una serie de capas celulares (epidermis, mesocarpio, células cruzadas, células tubulares y testa). Se adhiere a la superficie exterior de la capa *de aleurona* [Inglett, 1970]. El pericarpio y la *cofia* son la mayor fuente de fibra dietética en los componentes anatómicos del maíz. Su composición es similar a la fibra dietética común en otros cereales. Está formado principalmente por celulosa, hemicelulosa, lignina [Martínez y col., 2001].

2.2.2 Germen

Está formado principalmente por el eje embrionario y el escutelo. El escutelo forma casi el 90% del germen y sirve como depósito de los nutrientes movilizados y utilizados durante la germinación; el eje embrionario comprende el 10% del germen y es una estructura que desarrollará la planta durante la germinación [Inglett, 1970]. El germen está constituido especialmente por lípidos y proteínas, en el se encuentran el 83% de los lípidos, el 26% de las proteínas del grano. Además, se encuentran en cantidades menores almidón, cenizas y azúcares [Watson y Ramstad, 1987].

2.2.3 Cofia

La cofia es la estructura celular por medio de la cual el grano se encuentra unido a la mazorca. Contiene una capa exterior fibrosa que permite la absorción de agua y nutrientes disueltos desde el olote durante el crecimiento de los granos. La conexión del grano al olote se establece por la capa hilar de la cofia y funciona como sellador cuando el grano de maíz llega a su estado maduro [Inglett, 1970].

2.2.4 Endospermo

Constituye la reserva energética principal de la semilla, considerando que aproximadamente el 86 - 89% del peso del grano de maíz es almidón. El cual se presenta en la forma de gránulos con un tamaño de los mismos que oscila entre 5 a 30 micras y están

unidos entre si, por medio de una matriz proteica [Inglett, 1970]. El endospermo del maíz está constituido por endospermo harinoso y endospermo duro o córneo; según el tipo de maíz, varían las proporciones de región córnea y harinosa (figura 2.2).

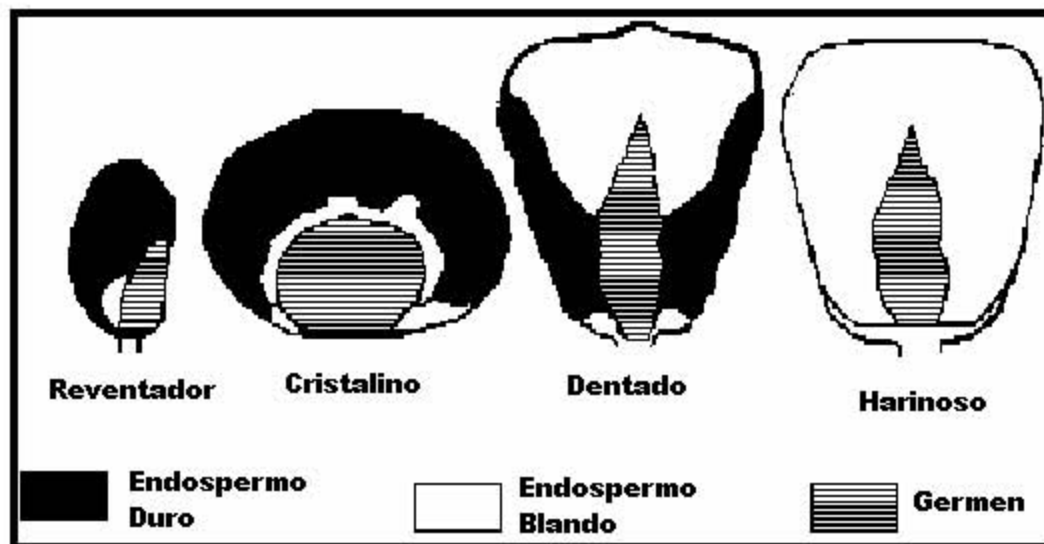


Figura 2.2: Tipos de maíz según su distribución de almidón [Klaus y Karen, 1991].

La distribución del endospermo en el grano de maíz caracteriza a cada variedad de maíz, donde es posible distinguir dos fracciones. En la siguiente figura (2.3), el almidón harinoso que está representado por la región de color negro en el centro y la región de color blanco que representa la proporción de almidón duro o corneo. La parte harinosa rodea la fisura central del grano y es opaco para transmitir la luz. La opacidad es debida a la refracción de la luz sobre los espacios de aire alrededor de los gránulos de almidón, los cuales resultan del desgarramiento de la delgada matriz proteica. En esta parte y debido a que la matriz no se alarga completamente esta se encoge durante el secado del grano, motivo por el cual los gránulos asumen una forma redondeada. El endospermo córneo se encuentra principalmente a los lados del grano, tiene entre 1.5 a 2.9% mayor contenido de proteína que el harinoso, la matriz proteica que lo cubre es más gruesa, la cual se compone de material proteico amorfo, donde están insertados cuerpos proteicos discretos que a su vez están compuestos casi completamente de zeina, prolamina cuya composición carece prácticamente de lisina un importante aminoácido esencial. La matriz permanece intacta durante el secado, ahí los gránulos de almidón se encuentran comprimidos en forma poliédrica, son de aspecto traslúcido y no tienen cavidades aéreas, además presenta la

peculiaridad de transmitir luz. Las proporciones de endospermo córneo y harinoso, dependerán de la variedad de maíz y las propiedades físicas del grano [Klaus y Karel, 1991].

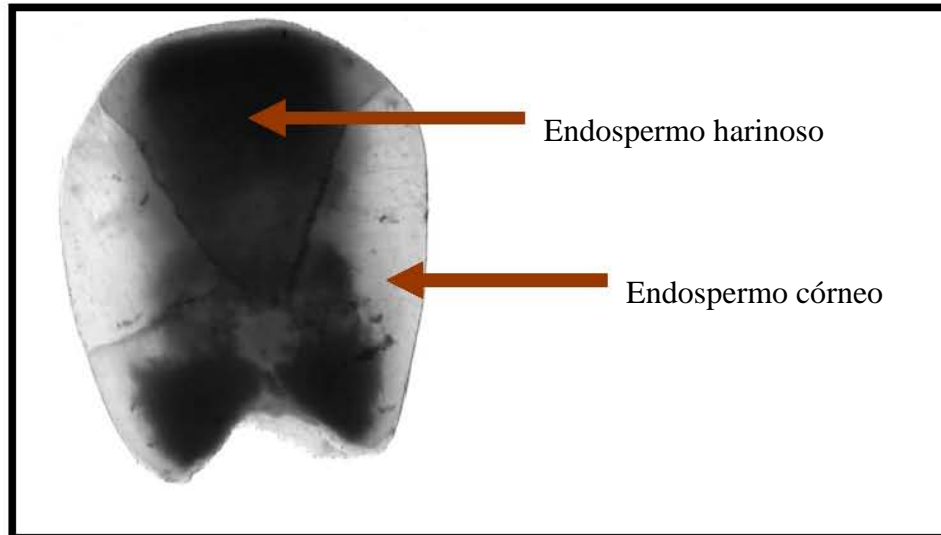


Figura 2.3: Corte longitudinal del endospermo de maíz [Palacios-Fonseca].

2.2.4.1 Proteínas y lípidos del endospermo

Las proteínas en el endospermo se localizan en forma de cuerpos proteicos. Estos están compuestos fundamentalmente por una prolamina llamada zeína. La zeína, proteína constituida por un alto porcentaje de restos de prolina que aportan rigidez a la molécula. Además de esto, su baja solubilidad en agua es determinante para no hidratarse y exhibir propiedades funcionales que expliquen la flexibilidad observada en la tortilla.

Los lípidos del endospermo pueden dividirse en lípidos en los almidones (46%) y lípidos fuera de los almidones (54%). De los lípidos fuera de los almidones, localizados fundamentalmente en la capa de aleurona, el 90% son saponificables, distribuidos según: triglicéridos (48%), ácidos grasos libres (19%), fosfolípidos (4%) y glicolípidos (6%) [Weber, 1987]. Los lípidos en los almidones tienen carácter endógeno y son difíciles de extraer del endospermo con solventes orgánicos. Son mayoritariamente ácidos grasos libres (51-62%) y lisofosfolípidos (24-46%) [Morrison, 1993].

2.2.4.2 Carbohidratos del endospermo

El mayor constituyente químico del grano de maíz son los carbohidratos, los cuales se encuentran distribuidos dentro del grano en todos los tejidos.

2.2.4.2.1. Carbohidratos simples

Los principales monosacáridos libres en el endospermo son la D-fructosa y la D-glucosa, que se encuentra encontrándose en proporciones aproximadamente iguales. Los disacáridos se componen principalmente de sacarosa, aunque también contiene niveles bajos de maltosa los trisacáridos se encuentran en menores cantidades, encontrándose bajo niveles de rafinosa, [Inglett, 1970].

2.2.4.2.2. Carbohidratos complejos

El principal polisacárido en el grano es el almidón. Este se localiza principalmente en el endospermo, que es tejido primario de almacenamiento del mismo. El almidón es un polisacárido de las plantas superiores, soluble en agua; aunque, los polisacáridos solubles en agua que se encuentran relacionados con el almidón pueden estar en altas concentraciones en algunos genotipos de maíz.

2.3 Biopolímeros derivados del maíz: Almidón

Aunque varios polímeros se utilizan en la industria de alimentos, el almidón es uno de los más importantes. Fuera de esta industria tiene aplicaciones en la industria química donde pueden modificarse sus propiedades reológicas para formar papel, adhesivos, textiles, tabletas farmacéuticas, edulcorante -jarabe de maíz rico en fructosa o bien en etanol [Rooney y Serna-Saldívar, 1987]. A partir del almidón se pueden obtener otros subproductos como el jarabe de maíz que esta compuesto por dextrosa, la que se puede utilizar en la elaboración de productos tales como aminoácidos, antibióticos y aditivos alimenticios. Lo anterior coloca al maíz como un cereal importante y muy versátil por la cantidad de procesos industriales en que se emplea como insumo o en el que alguno de sus derivados se usa como materia prima [Hart, 1991].

El almidón constituye la mayor parte de los carbohidratos digeribles de la dieta habitual, compuesto fundamentalmente por glucosa. Asimismo representa una fracción importante en un gran número de productos agrícolas como son los cereales cuyo contenido varía del 30-80%, leguminosas con un 25-50% y tubérculos en los que el almidón representa entre un 60-90% de la materia seca [Bello-Pérez y Paredes-López, 1999]. En el grano de maíz se encuentra como ya mencionamos principalmente en el endospermo y constituye del 75 al 80% de éste cuando está seco; el porcentaje depende de la variedad, condiciones de crecimiento y madurez. En menor proporción se encuentra almacenado el almidón en germen y pericarpio.

2.3.1 Gránulo de almidón

Los almidones se encuentran habitualmente en forma de gránulos o agregados de polímeros unidos intramolecularmente mediante enlaces de hidrogeno. Estos están formados de dos tipos de macromoléculas o polímeros muy similares: amilosa y amilopectina. La amilosa que representa alrededor de 27% y la amilopectina que representa alrededor del 73% en el almidón normal y esta relación está determinada por el tipo de fuente botánica de la cual proviene el almidón y de los genes presentes en la planta.

Dentro de las células alargadas se encuentran paquetes de gránulos de almidón, los cuales están en celdas que contienen gránulos de 5 a 30 micras de diámetro, cubiertos en una matriz continua de proteínas hidrosolubles que están ligadas al medio granular del almidón.

Conceptos modernos consideran al gránulo de almidón como un polímero vítreo, el cual existe en estado vítreo hasta que por calentamiento alcanza la temperatura de transición vítrea (T_g) donde las moléculas pierden su organización y el polímero se vuelve gomoso. Con calentamiento adicional eventualmente alcanza la temperatura de fusión (T_m), en la cual el gránulo pierde su organización completamente [Rooney y Huang, 2001].

2.3.1.1 Amilosa

La molécula de amilosa es una cadena lineal compuesta de unidades de α - glucosa (OH de carbono anomérico en posición axial). Sólo aparecen con enlaces α -D-(1 \rightarrow 4), por lo que su estructura es lineal (esto no significa que las cadenas sean rectas, sino que se enrollan formando una hélice), con un grado de polimerización de 100 a 1000 unidades de glucosa. Este polímero es insoluble porque existe en forma de hélice dentro del gránulo de almidón y es la parte amorfa del almidón. La amilosa se cristaliza en dos formas que dependen de su densidad de empaquetamiento y de la cantidad de agua asociada con ella. La estructura de empaquetamiento del tipo B son hélices dobles (figura 2.4), las cuales son llenadas en anti-paralelo de modo hexagonal (cada giro está formado por seis moléculas de glucosa) formando un arreglo monoclinico que puede unir dentro de esta estructura seis moléculas de agua (36 H₂O/ unidad) [Imberty y col., 1988; Sajilata y col., 2006].

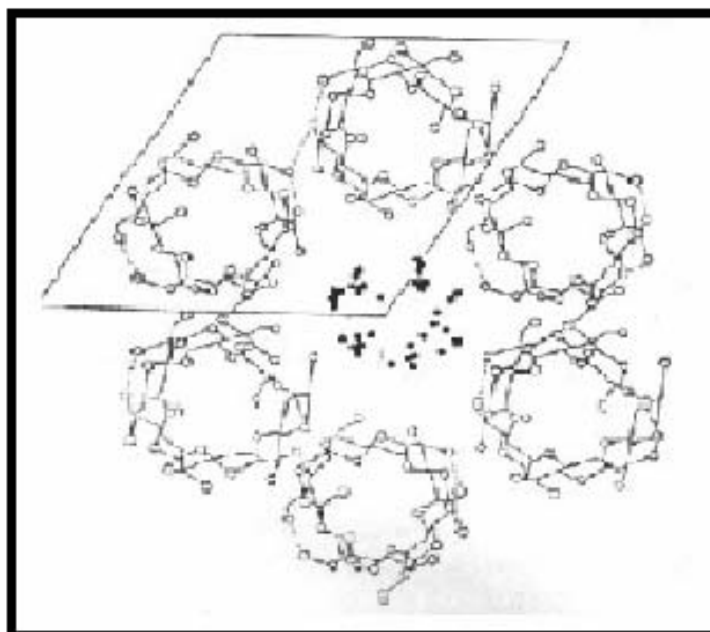


Figura 2.4: Amilosa-B [Galliard, 1987].

El tipo A es muy similar al tipo B (figura 2.5), excepto que en el arreglo monoclinico es ocupado por otra doble hélice. En este tipo, solo 8 moléculas de agua por unidad son insertados entre las dobles hélices [Imberty y col., 1988; Sajilata y col., 2006]. Así los cristales “A” están empaquetados más estrechamente y tienen menos agua que los cristales “B”.

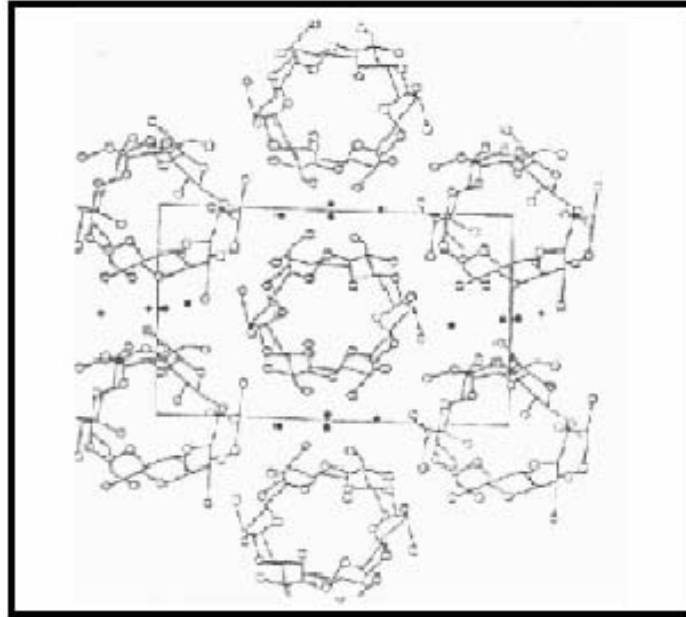


Figura 2.5: Amilosa-A [Galliard, 1987].

2.3.1.2 Amilopectina

La molécula de amilopectina es ramificada y muy larga por el hecho que comprende moléculas de amilosa conectadas por enlaces α -D-(1 \rightarrow 6) a un tronco central de unidades de glucosa. Puede contener aproximadamente 40000 unidades de glucosa.

Se ha observado que la amilopectina exhibe una estructura en forma de “arbusto” (figura 2.6), por lo cual no es capaz de formar un cristal organizado [French, 1973]. Sin embargo, algunas áreas (conocidas como “Cluster” en inglés o racimos) pueden presentar cristalinidad y se sugiere que esto se debe a la asociación paralela entre las ramificaciones (moléculas de amilosa) de una o varias moléculas de amilopectina. El área amorfa se localiza básicamente en el punto donde se unen las ramificaciones en el tronco central [Moran, 1982].

En la figura 2.7 se muestran los segmentos de cadenas designados como A, B y C; así como racimos de cadenas que son una característica común en varios modelos de amilopectina. Las cadenas A son la unión de residuos moleculares con un enlace 1,6. Las cadenas B son la unión a través de un enlace 1,6 pero puede llevar 1 o más cadenas A y/o B. La cadena C lleva exclusivamente la cadena con el grupo reductor.

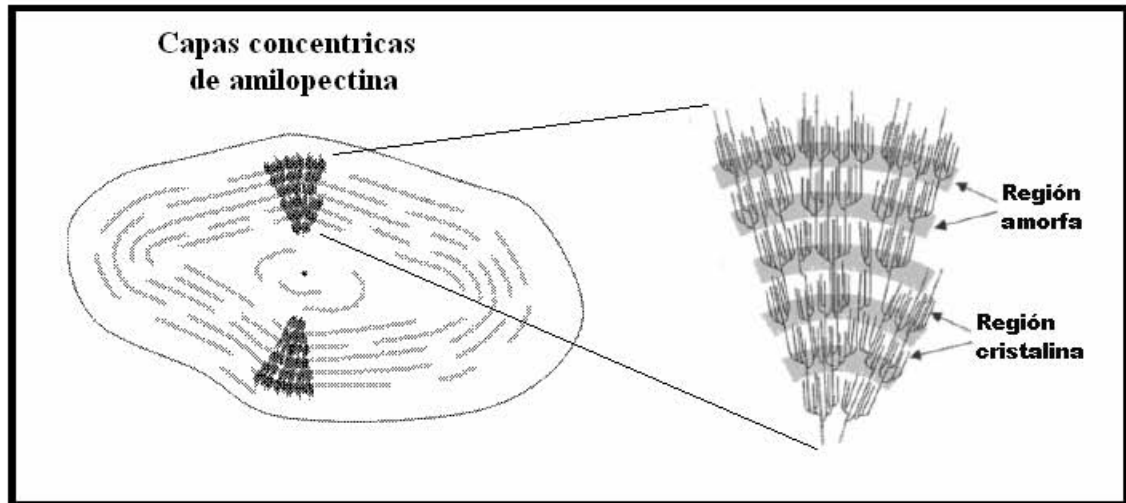


Figura 2.6: Capas concéntricas de amilopectina y su organización de regiones amorfas y cristalinas. [Sajilata y col. 2006].

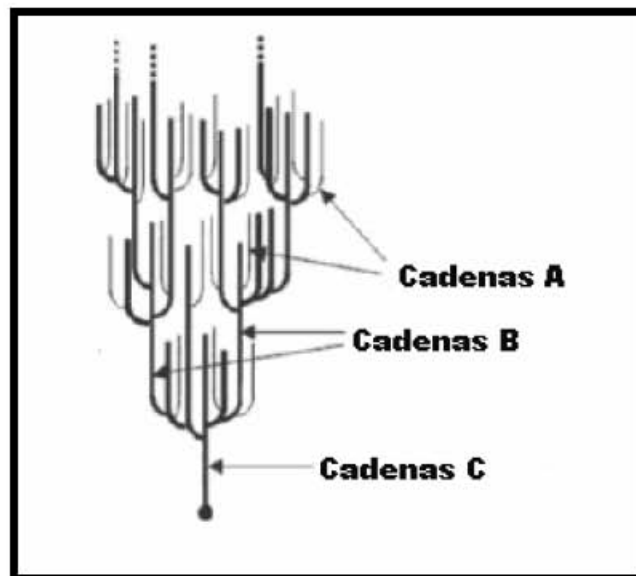


Figura 2.7: Designación de segmentos y racimos de cadenas características para la amilopectina. [Sajilata y col. 2006].

La amilopectina es la responsable de la estructura cristalina del gránulo de almidón, el cual consiste de áreas cristalinas (cristales, micelas) y no cristalinas (amorfas, fase gel), arregladas en capas concéntricas (figura 2.6). Así el gránulo de almidón está organizado en una estructura en forma de anillos, las moléculas de amilopectina son perpendiculares a los anillos que están dirigidas hacia la superficie exterior del gránulo, estas macromoléculas se

encuentran orientadas a lo largo de un eje imaginario que se extiende desde el hilio (centro) hasta el exterior del mismo. De la misma manera, el extremo reductor se orienta hacia el exterior. Debido a esta orientación, las moléculas forman regiones cristalinas y no cristalinas. Las capas cristalinas están conformadas por dobles hélices de las ramificaciones de la amilopectina, mientras que los puntos de las ramificaciones están en las zonas amorfas.

2.3.2 Clasificación en cuanto a su estructura

Los almidones presentan cuatro tipos de estructuras cristalinas que dependen de su origen botánico. En la figura 2.8 se muestran los difractogramas para diferentes tipos de almidón.

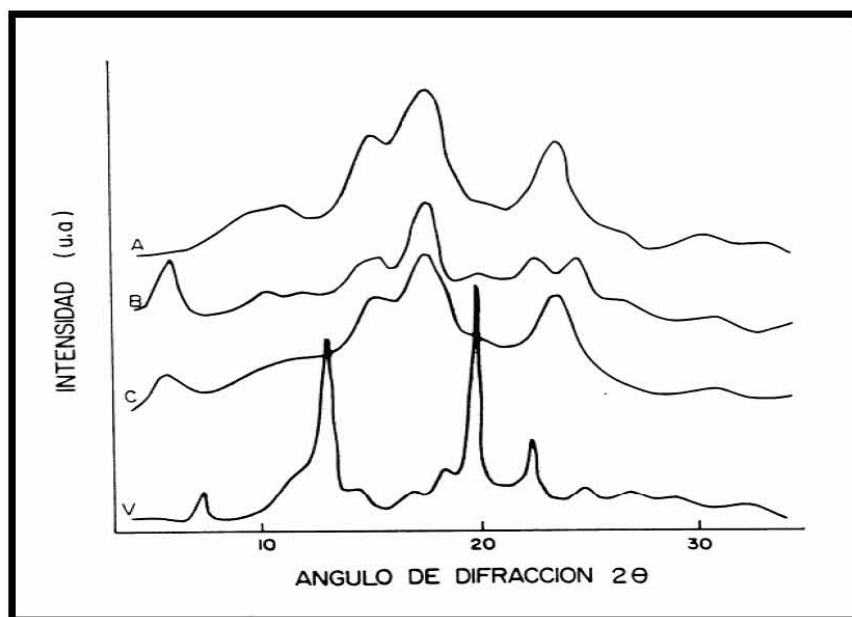


Figura 2.8: Diffractograma de almidones de diferente fuente botánica [Rodríguez y col. 2001].

Actualmente se ha aceptado que los almidones de cereales (arroz, trigo y maíz) presentan un patrón tipo A; los almidones de tubérculos presentan un patrón tipo B y almidones de maíz con alto contenido de amilosa (>40%), así como por almidón retrogradado; y en almidones de ciertas raíces y semillas de legumbres (chicharo y fríjol) dan un patrón tipo C, que es una mezcla intermedia del patrón tipo A y B. Otro tipo de patrón es el V, y que es característico cuando se forma un complejo de inclusión ó clatrato en el interior de la hélice de la amilosa [Zobel, 1986].

Zobel en 1964 y 1988 designa un modelo para la clasificación de la estructura del almidón según el ángulo que forman los difractogramas, como se observa en la figura 2.9, además de las capas concéntricas de amilosa (blanco) y amilopectina (negro).

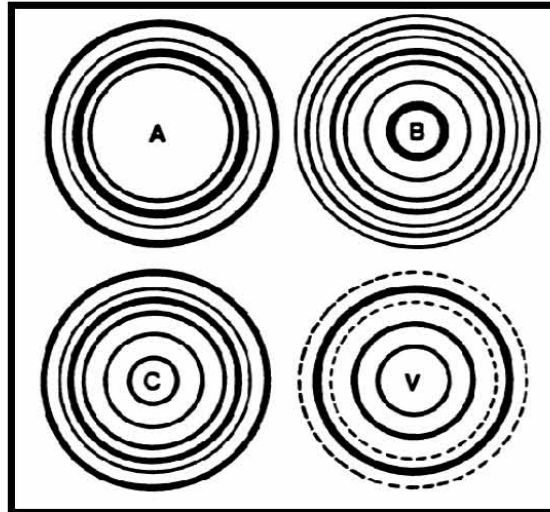


Figura 2.9: Representación esquemática de la estructura del gránulo de almidón de los patrones de difracción de rayos X de varios almidones para la clasificación de los tipos A, B, C, y V [Zobel, 1988].

Imberti y col. (1988) describen en detalle la estructura tridimensional cristalina del almidón tipo A del modelo aceptado actualmente: sistema cristalino ortorrómbico centrado en el cuerpo (símbolo *I* del alemán innerzentrien) (figura 2.10), describiendo la orientación del plano con los *índices de Millar*, con los símbolos *h, k, l*; parámetros de red $a \neq b \neq c$; ángulos $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

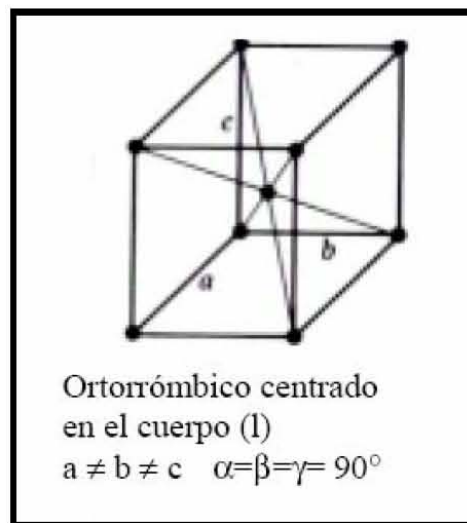


Figura 2.10: Sistema cristalino de red Ortorrómbico I, de los catorce retículos de Bravais [Sands, 1988]

2.3.3 Propiedades físicas del almidón

Muchos componentes poliméricos de los alimentos son termoplásticos y están sujetos a la plastificación con el agua, sus propiedades físicas son controladas con la temperatura y la cantidad de agua presente.

Se han examinado los gránulos de almidón al microscopio con luz polarizada y la mayoría de ellos exhibe una birrefringencia, observándose una cruz de malta bien definida, lo que indica que existe un alto nivel de organización molecular por el arreglo ordenado en forma radial de las cadenas de amilosa y amilopectina.

2.3.4 Modificaciones térmicas del almidón

Las transformaciones fisicoquímicas inducidas o provocadas por el calor, dan como resultado una serie de eventos bajo ciertas condiciones. Estos eventos son la gelatinización, gelación y retrogradación, dichas transformaciones fisicoquímicas son de vital importancia para obtener las modificaciones requeridas por el medio industrial o de investigación vía fisicoquímica, con tratamiento enzimático o cualquier otro método deseado, ya que se pueden alterar dramáticamente sus propiedades nativas [Jenkins y Donald, 1995]. A continuación se ampliará la explicación sobre los cambios o transformaciones fisicoquímicas (gelatinización, gelación (pastificación) y retrogradación) que sufre el almidón en un medio acuoso bajo tratamiento térmico.

2.3.4.1 Gelatinización

El proceso de gelatinización es un término usado para describir la pérdida del orden molecular (colapso molecular) que se manifiesta dentro del gránulo del almidón, asociada con el calentamiento del almidón en agua, el cual cambia de una forma semicristalina (la cual no es digerible) a una forma eventualmente amorfa (digerible). Esta transformación va acompañada de cambios irreversibles en sus propiedades, como absorción de agua, hinchazón del grano, fusión de la parte cristalina, pérdida de la birrefringencia, aumento en la viscosidad y la solubilidad del gránulo. La fase inicial del proceso de gelatinización y el rango durante el cual se lleva a cabo es determinado principalmente por la concentración

del almidón en solución, el método de observación, origen y forma del gránulo, y la homogeneidad dentro del grano.

La temperatura en la cual este cambio ocurre se le llama temperatura de gelatinización (T_p). En condiciones de exceso de agua, se rompen los puentes de hidrógeno de la región amorfa del gránulo, permitiendo que el agua se asocie con los grupos hidroxilos libres. Esto está definido por la movilidad de las cadenas de los polímeros por encima del valor de la temperatura de transición vítrea (T_g), y ocurre el cambio de estado vítreo a plástico en las regiones amorfas. Lo cual aumenta la movilidad molecular en dichas regiones, siendo un proceso reversible y permitiendo el hinchamiento del grano. El gránulo se expande al mismo tiempo que los polímeros se hidratan. Posteriormente se produce una transición molecular irreversible, la fusión de las dobles hélices propias de la región cristalina.

Existen dos tratamientos hidrotérmicos que modifican las propiedades fisicoquímicas del almidón sin destruir la estructura granular, los cuales son: el anillado (“annealing”) y tratamiento combinado calor-humedad. Ambos tratamientos requieren el almacenamiento del almidón a un contenido de humedad y temperatura específicos durante un periodo de tiempo determinado. Estas modificaciones ocurren a temperaturas por encima de T_g y las moléculas pierden su organización. Ocurren en las áreas amorfas del almidón cuando se encuentra en estado gomoso [Jacobs y Delcour, 1998]. Con calentamiento adicional eventualmente alcanza la temperatura de fusión (T_m), en la cual el gránulo pierde su organización completamente [Rooney y Huang, 2001].

El tratamiento físico de anillado requiere la incubación de los gránulos de almidón en exceso de agua o a contenidos intermedios, esto es por encima de 40% de agua (p/p), durante un período de tiempo determinado a temperatura por encima de la transición vítrea. Después de este tratamiento no cambia el tamaño del gránulo ni la forma, ni existe la formación de complejos entre amilosa y lípidos. En los perfiles de DSC aumenta la temperatura de gelatinización y se estrecha el rango en el cual ésta ocurre.

El tratamiento calor humedad se realiza incubando gránulos de almidón a bajos contenidos de humedad, es decir, por debajo de 35% de agua (p/p), durante un cierto

período de tiempo y temperatura por encima de la temperatura de transición vítrea y menor a la temperatura de gelatinización (T_p) [Jacobs y Delcour, 1998]. No obstante, se pueden trabajar temperaturas mayores pues el almidón se encuentra con un contenido de humedad que no es suficiente para soportar la gelatinización; lo anterior produce una reorientación de la estructura en las regiones amorfas del grano quedando semejantes a la región cristalina, lo cual interfiere con la habilidad de hinchamiento y desestabilización de los cristales.

La gelatinización del almidón converge en cambios físicos como la pérdida de birrefringencia debido a la rápida hidratación y el aumento de tamaño en los gránulos del mismo, pero principalmente a la fusión de las regiones ordenadas dentro del gránulo.

El fenómeno de birrefringencia, o doble refracción, se descubrió en Islandia por Erasmus Bartholin en 1669, y consiste en que un haz luminoso, estrecho y monocromático, al penetrar en ciertos materiales da lugar simultáneamente a dos haces refractados distintos. Los medios que poseen esta propiedad se llaman birrefringentes. Los sólidos cristalinos, salvo los del sistema cúbico, son birrefringentes. Este fenómeno es debido a que los medios birrefringentes son óptimamente anisótropos y en ellos la luz se propaga con una velocidad que no sólo depende de su longitud de onda, sino también de su dirección de propagación. Los rayos obtenidos por doble refracción transportan ambos luz polarizada.

En un cristal uniaxial, uno de los rayos, el que obedece aparentemente las leyes de la refracción, y que recibe el nombre de rayo ordinario, propaga luz que vibra perpendicularmente al plano de la sección principal del cristal, mientras que el otro, llamado rayo extraordinario, transporta una vibración situada en el plano de la sección principal. La pérdida de birrefringencia del sistema almidón-agua con 0.1 y 0.2% contenido de almidón puede ser usado para determinar la gelatinización del almidón con un microscopio de luz polarizada. La fusión y la cristalización son soportadas por estudios de difracción de rayos X (XRD), los cuales muestran la pérdida de semicristalinidad, y la pérdida de estructura ordenada es soportada por estudios de calorimetría [Eliasson y Larsson, 1993].

El fenómeno de difusión de agua dentro del gránulo de almidón promueve su asociación con los grupos hidroxilos de la amilosa y la amilopectina, provocando una

hidrólisis parcial del almidón de maíz. Además de esto, la parte cristalina del almidón, la amilopectina, pierde su estructura y la molécula se disocia, de esta forma, la amilasa salival, encargada de hidrolizar el almidón, ve facilitado su proceso por la acción de la gelatinización, pero es la amilasa pancreática la cual se ve realmente beneficiada, ya que es la encargada de la hidrólisis de la amilopectina. De esta forma el proceso de gelatinización del almidón de maíz facilita la digestión del biopolímero y permite que mayor parte de la molécula se pueda transformar en glucosa para utilizarla en el ciclo de Krebs para producir energía y poder realizar las actividades diarias propias del ser humano [Camire y Krumhar, 1990].

2.3.4.2 Gelación (Pastificación)

Es el siguiente fenómeno a la gelatinización, e involucra además del hinchamiento, exudación de componentes moleculares, lo cual provoca la formación de una red tridimensional de amilosa en el exterior de los gránulos y eventualmente la ruptura total de los gránulos. Para muchos almidones, la textura y viscosidad de los cambios cuando la pasta es enfriada y se forma un material viscoelástico o geloso, lo cual depende del contenido de amilosa [Atwell y col., 1988].

De los dos biopolímeros, la amilosa comienza a gelificar justamente después de la gelatinización y en pocas horas termina este proceso (Waniska y Gómez, 1992). Por esto se considera que la amilosa, debido a su naturaleza lineal, es la responsable de la gelación del almidón. La amilopectina tarda mucho más tiempo y requiere una concentración mayor al 15% para que gelifique; los geles que forma este polímero son turbios, elásticos y pueden ser revertidos por calentamiento a 100° C (Biliaderis, 1991a).

2.3.4.3 Retrogradación

La retrogradación se puede ver como el fenómeno opuesto a la gelatinización. Los polímeros solubles del almidón y los fragmentos insolubles se reasocian después del calentamiento y forman una estructura ordenada que conduce a la cristalinidad, la cual se puede determinar por el cambio del patrón de difracción de rayos X. Eventualmente se forman cristales, acompañados por un incremento gradual en la rigidez y la separación de

fases entre el polímero y el solvente (sinéresis). La aparición de cristales influye en la textura, digestibilidad y aceptación de los productos elaborados con base en almidón por parte del consumidor [Biliaderis, 1992; Rooney y Huang, 2001]. Este fenómeno ocurre en geles de almidón o en productos horneados, fritos, o extraídos, donde las moléculas de almidón interaccionan después del añejamiento [Tester y Debon, 2000].

La retrogradación del almidón ocurre en dos procesos: rápida gelación de la amilosa por la formación de segmentos de dobles hélices y lenta recristalización de cadenas cortas de amilopectina.

2.4 Tratamiento térmico-alkalino (cocimiento-reposo)

Es un método muy antiguo para la preparación de diversos productos nixtamalizados, como la tortilla que es la forma principal; producto rico en calcio por la adición de cal durante su cocción y reposo, siendo una buena fuente de calcio en el pueblo mexicano y Centroamérica. En este proceso térmico-alkalino (figura 2.12), las diferencias informadas están más asociadas con los niveles de agua y cal utilizados y el tiempo de cocción, que con los pasos específicos del proceso. El tratamiento térmico alkalino al cual se somete el maíz da como producto central la masa, la cual, luego se transforma en diversas formas, entre las cuales la tortilla es la principal.

Desde el punto de vista técnico, Illescas (1943) fue uno de los primeros que describió el proceso como se practica en México. De acuerdo a Serna y col. (1990), este consiste en mezclar una parte de maíz con dos a tres partes de agua hirviendo con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (hidróxido de calcio) de 1 al 2%, en base al peso del grano, esta mezcla se cuece de 40 a 120 minutos, a temperaturas que oscilan entre 70 y 96° C. Se suspende la cocción cuando el pericarpio se desprende del grano(nixtamal), el cual se deja en reposo en la solución caliente, por un tiempo de 3 a 16 horas, se drena el licor (nejayote), el grano tratado se lava dos veces, se muele en un molino de discos de piedra, posteriormente se seca con temperaturas de 40 a 55° C, hasta llegar a una humedad del 12 %, la cual se muele en un molino de martillos fijos (pulvex),para obtener harina de maíz nixtamalizado. El agua de cocción y remojo se conoce como nejayote. Al maíz cocido se le llama “nixtamal” y de ahí

el nombre de “nixtamalización”. La adición de cal y el proceso de cocción, remojo y lavado, ayudan a la remoción del pericarpio maíz.

En esencia el proceso de nixtamalización del maíz no ha sufrido cambios significativos desde la época de la conquista, salvo la industrialización del proceso en el año de 1945 para producir harinas nixtamalizadas.

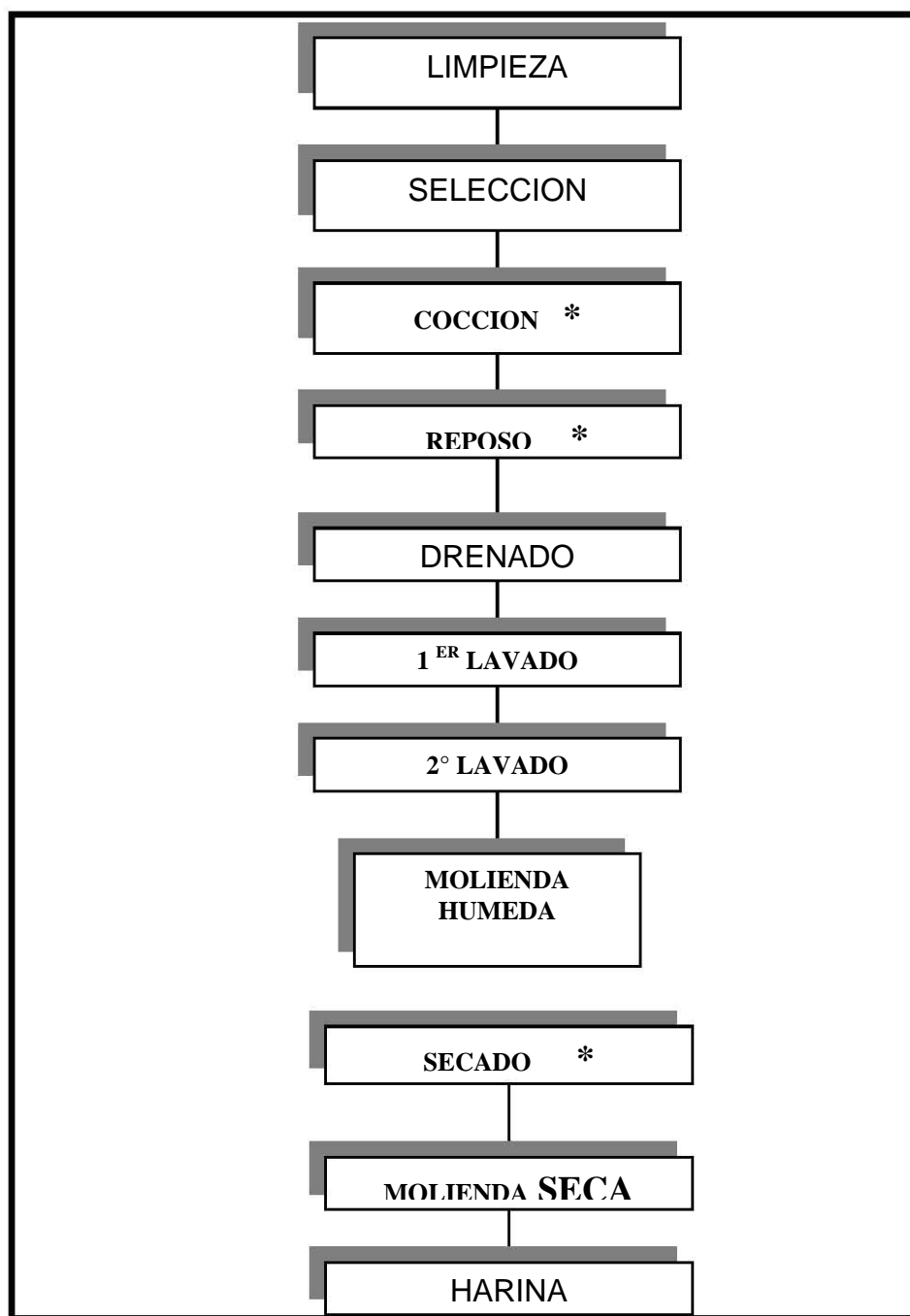


Figura 2.11: Diagrama del proceso de nixtamalización [Serna y col., 1990].

2.4.1 Efectos del proceso térmico alcalino

Algunos de los efectos son principalmente de naturaleza física, ya que causa un rompimiento parcial del pericarpio, que se remueve fácilmente con una simple flotación y lavado del grano. La eliminación del pericarpio facilita la absorción de agua y de calcio, ya que esta fracción representa la primera barrera a este mecanismo. La destrucción de esta estructura física del grano de maíz junto con otras alteraciones que sufre el endospermo fue estudiado por primera vez por Paredes-López y Saharopulos en 1982, utilizando microscopia electrónica de barrido. De acuerdo a estos autores, la cocción alcalina induce una hinchazón y debilitamiento de la pared celular y de los componentes de la fibra, lo que permite y facilita la eliminación del pericarpio. Estos cambios se inician durante la cocción, continúa durante el remojo del grano y se completa el proceso durante el lavado del maíz cocido para dar el nixtamal.

Durante el proceso de nixtamalización tradicional, también en el endospermo se saponifican los lípidos presentes en la periferia, en la capa de la aleurona, formando sales de calcio con los ácidos grasos liberados. La presencia de estas sales disminuye la temperatura a la cual inicia la gelatinización. La capa aleurónica y sus células permanecen intactas y adheridas al endospermo periférico, sirviendo como una estructura de retención del mismo. Aunque las proteínas del endospermo permanecen adheridas a los gránulos de almidón, la cocción con cal cambia la apariencia física de los cuerpos proteicos, por lo menos en algunas áreas del grano. Los cambios se presentan en las paredes celulares del endospermo en el almidón, y la matriz proteica se debilita, especialmente durante el remojo [Gómez y col., 1987]. Posiblemente debido a la característica de semipermeabilidad de la capa aleurónica se reduce la pérdida de proteínas del endospermo y el nitrógeno que se pierde podría ser de proteínas de muy bajo peso molecular [Serna-Saldivar y col., 1990, Paredes-López y Saharopulos, 1982].

Los gránulos de almidón aumentan de tamaño en todo el endospermo, hay un hinchamiento de las regiones amorfas (amilosa) del almidón debido a la difusión y absorción de agua, y a medida que avanza el proceso de gelatinización hay rupturas de las estructuras granulares, surgiendo una disolución de las moléculas de amilosa. Se forman

complejos de inclusión con ácidos grasos y la amilosa gelatinizada se cristaliza como amilosa tipo V [Bryant y Hamaker, 1997; Rooney y Almeida-Domínguez, 1995].

Al aumentar el tamaño los gránulos de almidón en el endospermo estos muestran una destrucción parcial y las proteínas de esta estructura del grano se quedan asociadas a los gránulos de almidón. Sin embargo, se ha indicado que ocurren cambios en la apariencia física de los cuerpos proteicos [Serna-Saldivar y col. 1990) en algunas regiones del endospermo y el almidón está parcial o totalmente gelatinizado [Chang y Hsu, 1985]. Gómez y col. (1989), confirmaron y ampliaron las observaciones previas de cambios estructurales sufridas por los granos de maíz, sometidos al proceso de nixtamalización, tanto en el nixtamal como en la masa y en la tortilla. Asimismo, estos autores reportaron que la nixtamalización no causa una gelatinización total del almidón. Además, durante la molienda húmeda del nixtamal para producir masa, los gránulos de almidón sufren una gelatinización parcial, debido a la fricción que se genera durante el paso del nixtamal entre las dos piedras molidoras. El 5-9% del almidón gelatinizado forma el pegamento que ayuda a que exista una red continua entre los gránulos no gelatinizados y el resto de los componentes que forman la masa, puesto que muchos gránulos no han sido afectados [Bello y col., 2002].

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].

2.4.2 Efecto de nixtamalización sobre la biodisponibilidad de nutrientes

La nixtamalización para convertir el maíz a tortilla induce cambios importantes en el valor nutricional, debido principalmente a la utilización de hidróxido de calcio [Ca(OH)₂] para convertir el maíz en tortilla, lo cual incrementa el contenido de calcio en el producto significativamente. Los estudios de biodisponibilidad llevados a cabo por Braham y Bressani (1966) en animales experimentales demostraron que el calcio en el maíz tratado con cal (CaO) es un poco menos disponible (83.6%) que el calcio de la leche descremada (91.8%) pero superior al del maíz crudo. Sin embargo, la biodisponibilidad del calcio

aumentó a 94.8% cuando el maíz tratado con cal se suplementó con una mezcla de aminoácidos para llenar los requerimientos de estos nutrientes de la rata en crecimiento.

Posiblemente de acuerdo a estos datos la calidad de la proteína del maíz aumenta la bio-utilización del calcio y de otros nutrientes. La retención del calcio ingerido de maíz fue del orden de 59.0% mientras que el de la tortilla fue de 86.7%. La biodisponibilidad del calcio de un maíz de alto valor nutritivo (QPM) y de su respectiva tortilla, fue de 75.0 y 89.4% respectivamente, lo que confirma el efecto de la calidad proteínica sobre la biodisponibilidad. Tanto en el maíz normal como en el maíz QPM el proceso de nixtamalización tiene la capacidad de mejorar la relación Ca/P en la tortilla, Serna-Saldívar y col. (1992) informaron que la tibia y el fémur de los animales experimentales utilizados en sus estudios, que consumieron tortillas de maíz común tenían mejores propiedades, como densidad, contenido de cenizas y calcio, resistencia a las fracturas, peso y talla que los animales alimentados con maíz no nixtamalizado. Esto también se observó en las tortillas preparadas de maíces de alto valor nutritivo (QPM), cuyos resultados fueron superiores a los obtenidos con tortillas de maíz común. El calcio presente en la tortilla no solo fue bien utilizada biológicamente, sino también mejoró la retención del fósforo y del magnesio, minerales importantes en la estructura del hueso. Este es un hallazgo importante para la población que no consume alimentos con alto contenido en calcio, evitando el desarrollo de osteoporosis [Rodríguez y col., 1996]. Más aún, el hallazgo de que una mejor calidad en la proteína del maíz favorece la bio-utilización del calcio es de importancia nutrimental representando una razón adicional para la producción comercial del QPM para la población que depende del maíz para su nutrición [Bressani, 1990].

El contenido de calcio en los productos nixtamalizados es un aspecto de gran relevancia desde el punto de vista nutrimental, ya que para ciertos sectores de la población de los países en vías de desarrollo, su principal fuente de calcio lo constituyen estos productos.

Gutiérrez y col. (2007) reportaron el contenido de calcio en el endospermo del maíz QPM, en las capas más externas del endospermo (10% con respecto al peso total del endospermo), las capas subsiguientes, correspondientes: al siguiente 10% y el 80%

remanente en función del tiempo de reposo (figura 2.13). A partir de esta figura, los autores atribuyen este resultado a un tiempo crítico (t_c), relacionado con la permeabilidad parcial (percolación) en el pericarpio, lo cual permite la entrada directa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y agua a las capas más externas del germen y endospermo.

Los efectos son también de naturaleza química, ya que la presente información indica que la cocción alcalina destruye parcialmente las vitaminas del complejo B, carotenos, proteínas, grasas, minerales. Asimismo, hay un incremento en la biodisponibilidad de niacina, lo cual junto con una mejor relación de los aminoácidos isoleucina a leucina, contribuyen a que no se desarrolle la pelagra.

La cocción térmico-alcalina, origina, además, un conjunto de otros beneficios sobre la masa y/o las harinas: inhibe la actividad microbiana y por tanto ayuda a la conservación de estos productos y mejora parámetros como el olor, el sabor y el color [Bressani y col., 2001).

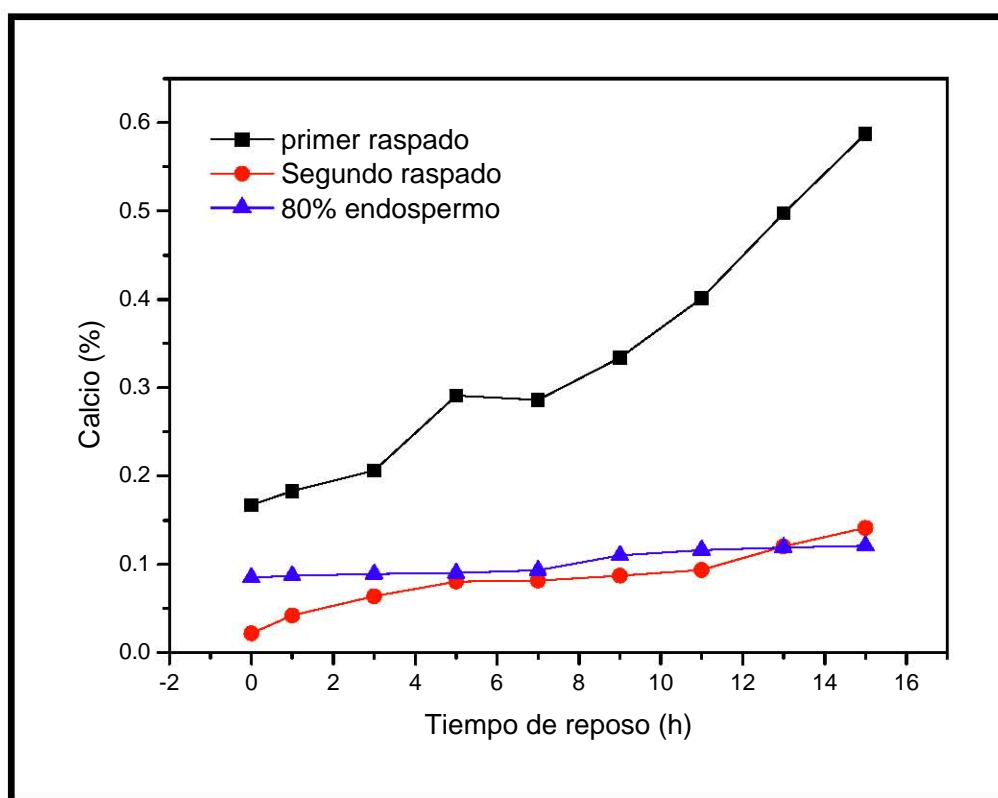


Figura 2.12: Contenido de calcio en el endospermo QPM 368C [Gutiérrez y col., 2007].

III. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Evaluar los cambios estructurales en el endospermo de una variedad con alta calidad proteínica (QPM H-368) durante la aplicación del tratamiento térmico alcalino en función del tiempo de reposo.

3.1.1 Específicos

Separar el endospermo de maíz QPM H-368C nixtamalizado en función del tiempo de reposo (0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 15 h) a través del método tradicional y empleando un sistema automatizado con control de temperatura, a fin de obtener muestras reproducibles.

Obtener fracciones del endospermo, del exterior al interior en los siguientes porcentajes: 10, 10 y 80%, en forma de harinas.

Estudiar la morfología de los gránulos de almidón en el endospermo nixtamalizado en función del tiempo de reposo usando Microscopia Electrónica de barrido (SEM).

Evaluar la calidad cristalina de harinas instantáneas de maíz elaboradas mediante el proceso tradicional de nixtamalización en función del tiempo de reposo.

Identificar los compuestos de calcio presentes en el grano de maíz nixtamalizado a través de patrones de difracción de rayos X.

Determinar la temperatura de gelatinización por calorimetría diferencial de barrido.

HIPÓTESIS

Los cambios microestructurales que se presentan en el endospermo del maíz de calidad proteínica (QPM H-368), por efecto del tratamiento térmico-alkalino, serán proporcionales al tiempo de reposo, repercutiendo en el gránulo de almidón nixtamalizado.

IV. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 *Maíz*

El grano de maíz usado en el experimento fue de la variedad de maíz de calidad proteínica (QPM) un híbrido H-368C, desarrolladas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y pecuarias (INIFAP) y el Centro de Investigación para el Mejoramiento del Maíz y del Trigo (CIMMYT). El maíz fue sembrado en mayo del 2004 en la zona experimental del subtrópico del bajo (INIFAP) localizado en Celaya, Guanajuato, México.

El grano de maíz se limpió mediante una criba móvil de 4.0 mm. para eliminar impurezas como son los productos extraños y granos no íntegros, polvo, etc.; la selección se llevó por una criba de 8.0 mm para seleccionar granos de tamaño homogéneo, se eliminaron manualmente granos picados, rotos y dañados por plagas.

4.1.2 *Almidón, amilosa y amilopectina de maíz*

Para el estudio de las propiedades estructurales y térmicas se utilizaron como referencia los siguientes productos: almidón (Sigma Chemical S-4126), amilosa (Sigma Chemical Co. A-7046) y amilopectina (Sigma Chemical Co. A-7046) de maíz.

4.2 Preparación de las muestras

4.2.1 *Tratamiento térmico alcalino*

Una vez limpio el grano de maíz, se depositó en un tanque de acero inoxidable con un sistema computarizado de nixtamalización (figura 4.1) en el cual se llevó el cocimiento alcalino. El sistema consta de dos termopares en la parte central del contenedor para medir la temperatura de la muestra y dos termopares de referencia, colocados en un dedo térmico junto a los dos termopares anteriores, que sirve de control para el sistema. Los datos son

alimentados a una PC, por una interfase RS232. Mediante este sistema es posible monitorear en tiempo real la temperatura de cocimiento.

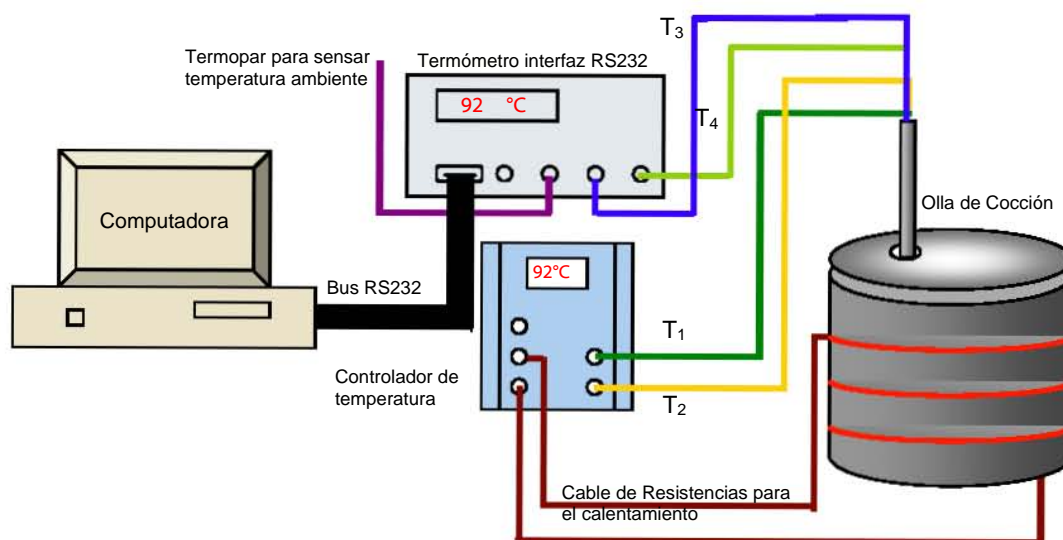


Figura 4.1: Sistema computarizado de nixtamalización.

La nixtamalización de los granos de maíz se realizó usando 2 litros de agua/1 kg de maíz, añadiendo 10 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se inició a temperatura ambiente a 22° C y tardo 25 min en alcanzar 92° C, ahí se coció 25 min.

El grano se mezcló suavemente con una cuchara de madera durante la cocción cada 10 minutos dando tres vueltas uniformes. Luego, el maíz cocido se dejó en reposo por 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 horas dependiendo del tiempo destinado para cada muestra, incluyendo las que no fueron reposadas (0 horas y control), esta última sin adición de hidróxido de calcio; para luego drenarlo del nejayote y posteriormente se lavó con agua corriente en 500 mililitros dos veces con ayuda de un colador.

4.2.2 Historia de cocimiento (perfil de temperatura-tiempo)

Se determinaron las historias térmicas para conocer el perfil de temperatura-tiempo en las etapas críticas de cocción y reposo; constituye un factor determinante para demostrar la reproducibilidad y repetibilidad en la preparación de las muestras.

La figura 4.2, muestra un cocimiento típico, en este cocimiento se incorpora el maíz, el agua y el hidróxido de calcio al mismo tiempo y se calienta de manera gradual el contenedor, se programa la temperatura de cocimiento mediante el controlador, cuando la muestra alcanza la temperatura de referencia el sistema la mantiene constante hasta el momento en que se define la cocción, que en este caso es el momento en que se puede desprender fácilmente el pericarpio.

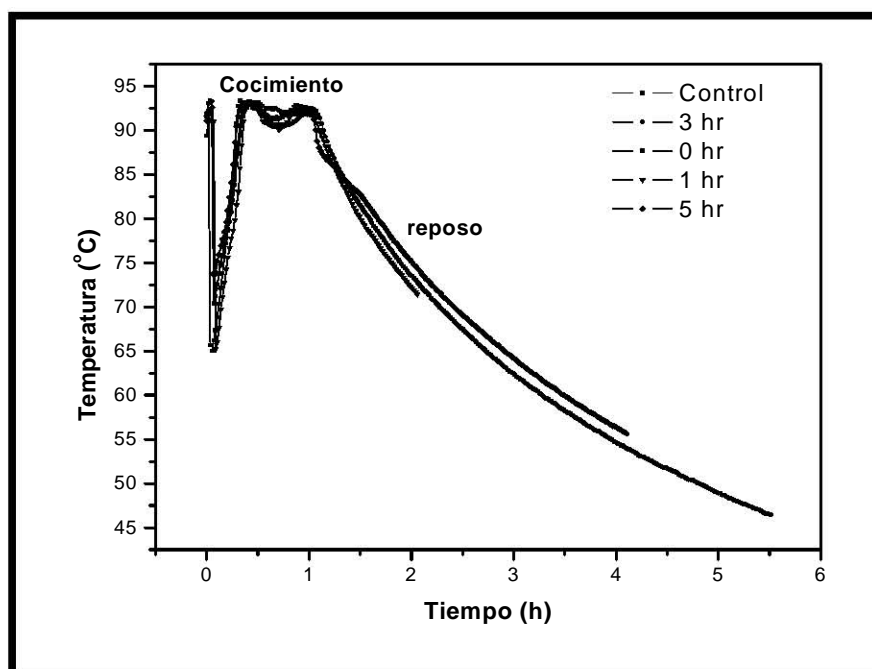


Figura 4.2: Historias de cocimiento de nixtamalización [Gutiérrez y col., 2007].

4.2.3 Granos nixtamalizados

Se extrajeron 200g de los granos nixtamalizados después de drenarlos del nejayote y lavarlos, se dejaron a temperatura ambiente durante dos horas para secar parcialmente el pericarpio y facilitar el desprendimiento del grano; 2/3 partes de la muestra se emplearon para la separación de las estructuras del maíz (pericarpio, germen y endospermo). El otro tercio corresponde a granos enteros que se fraccionaron en cortes longitudinales (figura 4.3).



Figura 4.3: corte longitudinal de grano nixtamalizado.

4.2.4 separación manual del endospermo

Al retirar manualmente el pericarpio y germen, dejando solo el endospermo (figura 4.4-A). Se tomaron 20 granos y se separo el endospermo córneo del harinoso (figura 4.4-B) con un equipo de instrumental dental, con una fresa de diamante utilizada a baja velocidad para evitar la gelatinización durante el proceso (COA, International, USA). En el caso del endospermo de maiz QPM, es importante notar que el almidón suave está localizado en la parte central del grano y posterior a la colocación del germen.



Figura 4.4: Endospermo nixtamalización (A) y endospermo corneo (B).

4.2.5 Elaboración de harinas

El endospermo nixtamalizado, ya seco se raspó con una lima de acero inoxidable a baja velocidad. Se raspó el 10% de la parte más extrema, el subsiguiente 10 % y el 80 % restante se molió en molino Braun KSM2, para así obtener fracciones de la harina nixtamalizada del endospermo de maíz y las cuales se pasaron por una malla 60 U.S. Después se envasaron en bolsas de polietileno y se guardaron a temperatura de 5° C para posteriores evaluaciones.



Figura 4.5: Endospermo nixtamalizado.

4.3 Técnicas experimentales utilizadas para el análisis de las muestras

4.3.1 Caracterización física del grano.

Las muestras para el análisis físico del grano de maíz fueron tomados de la clasificación hecha en la sección 4.1.1. Se tomó el peso promedio de 1000 granos con una balanza analítica de alta precisión OHAUS VOYAGER. Se realizó por triplicado y se calculó el peso promedio de los granos.

Los parámetros dimensionales del grano de maíz (grosor, largo y ancho) se realizaron en 100 granos de maíz, utilizando un vernier digital para semilla. Se calculó el valor promedio y desviación estándar. Para determinar la composición anatómica porcentual de las diversas partes del grano (pericarpio, germen, endospermo y cofia), éstas se pesaron para luego calcular sus porcentajes en base seca.

Se determinó la dureza seleccionando al azar 20 granos, que se midieron por una cara donde se encuentra el germen y los otros 10 granos por la cara opuesta, sometidos a una fuerza de penetración, a través de un punzón con un ángulo de 30°, el cual estaba conectado a un Analizador de Textura Universal TA-XT2. La prueba se realizó a una velocidad de 0.5 mm/s y una distancia de penetración de 2.00 mm. y por duplicado.

Para determinar el espesor de pericarpio se tomaron 50 granos al azar, se introdujeron en la solución alcalina (NaOH 2N) durante 5 horas a temperatura ambiente y se retiró por completo el pericarpio de cada grano. Posteriormente, mediante el uso de un micrómetro calibrado, se determinó el espesor del pericarpio. Se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

4.3.2 Microscopia electrónico de barrido de bajo vacío (LV-SEM)

Esta técnica permite conocer visualmente los cambios físicos del endospermo por efecto de las condiciones del proceso de nixtamalización, así como la detección de compuestos de calcio, permitiendo dar explicación de la manera en que el daño del grano facilita la difusión de iones de calcio al interior del grano.

La morfología de los granos de maíz nixtamalizados fue observada en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío modelo JEOL JSU-5600 LV. La muestra se colocó en un portamuestra, estas tienen un corte longitudinal, después se pegó sobre una cinta adherible de carbón electroconductiva, con el fin de que la emisión de electrones sea continua dentro del microscopio de barrido. El portaobjeto con muestra se introdujo al microscopio. Después se enfoca la muestra que se desea observar, cambiando los aumentos a decisión del operario.

Se consideraron tres zonas específicas del endospermo del grano de maíz como se muestra en la figura 4.6; la zona I corresponde al endospermo corneo, la zona II al endospermo harinoso y la zona III al endospermo periférico.

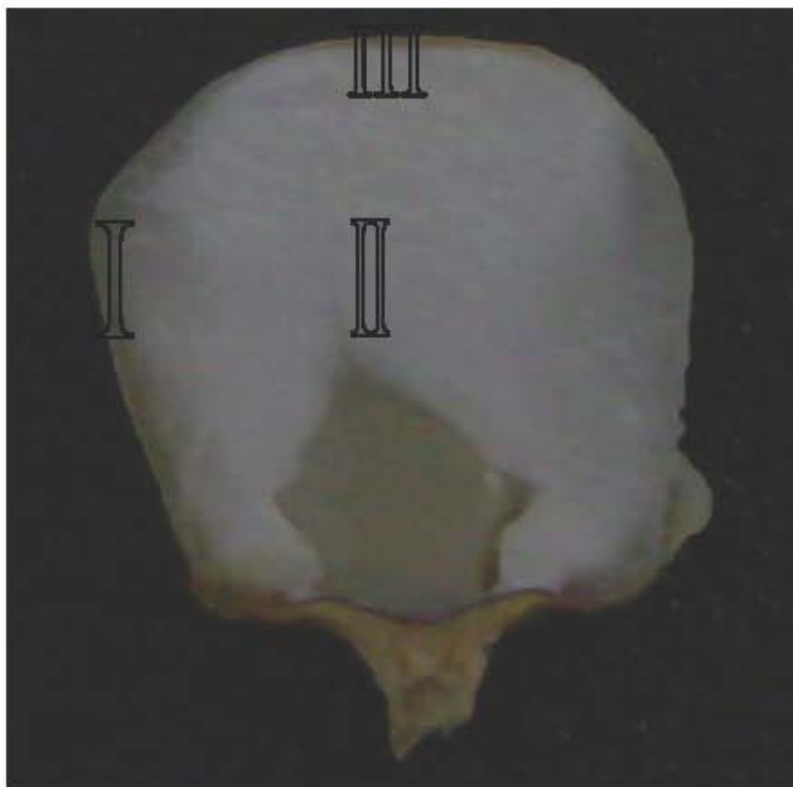


Figura 4.6: **Endospermo nixtamalizado.**

4.3.3 Difracción de rayos X (DRX)

Durante la nixtamalización hay cambios de estructura y formación de compuestos de calcio, que pueden ser identificados mediante la técnica de difracción de rayos X. por lo que fue necesario partir de las características estructurales del endospermo del grano sin tratamiento, para tenerlo como referencia y posteriormente compararlo con las fracciones del 10% de la capa externa, el siguiente 10% y el 80% restante del endospermo tratado.

Los patrones de difracción de rayos X se obtuvieron usando un equipo Siemens D 5000 operando con una diferencia de potencia de 35 Kv y una densidad de corriente de 15 mA, con una línea de radiación monocromática $\text{CuK}\alpha$ con $\lambda=1.5406 \text{ \AA}$. Los datos fueron recolectados de 4 a 30° sobre una escala a 2Θ , a una velocidad de $0.1^\circ \text{ seg}^{-1}$ y un tiempo de

conteo por paso angular de 5 segundos. Los difractogramas se analizaron usando el método propuesto por Rodríguez et al. (1996). De las harinas de endospermo del A, B y C: se colocó 1 gramo de muestra en un portamuestra para ser comprimida, finalmente se introdujo a la cámara de difracción de rayos X para su análisis.

Con el fin de analizar el comportamiento microestructural que se refleja en la variación de la cristalinidad en las harinas de endospermo de maíz nixtamalizado con diferentes tiempos de reposo se utilizó el método Rodríguez y col. (1996). El porcentaje de cristalinidad se calculó al separar la intensidad del espectro de difracción de la muestra que está constituido por una parte cristalina (región 3) y una parte amorfa (región 2) (figura 4.7). La cuantificación se efectuó al trazar líneas sobre los mínimos de los picos de la región 3, debajo de la línea azul es la contribución de lo que no es difracción, separando la contribución de la difracción del amorfo, por el equipo que tiene un monocromador secundario y se elimina. Se mide el área correspondiente al amorfo y al cristalino, es decir de la línea azul para arriba. Después se elimina lo correspondiente a la difracción del amorfo que es lo queda debajo de la curva roja y se mide el área correspondiente al cristalino. Se calcula por regla de tres, el área del cristalino a partir de la ecuación (4.1) y por diferencia se saca el amorfo.

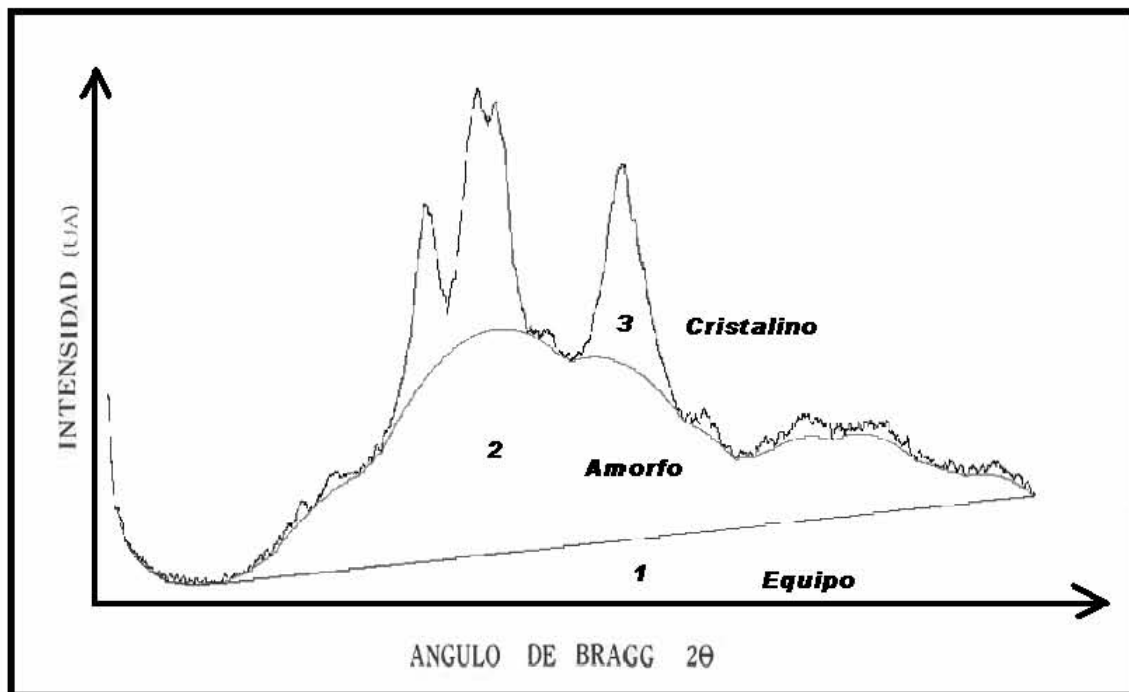


Figura 4.7: Diffractograma de rayos X [Rodríguez y col., 1996].

$$\%C = A_P / (A_T - R) \quad (4.1)$$

Donde %C, A_P , A_T y R representan el porcentaje de la cristalinidad en unidades relativas, el área de cada pico, el área total y ruido, respectivamente.

4.3.3.1 Estructura cristalina de los materiales

Los cristales tienen frecuentemente formas poliédricas características, limitadas por caras planas. Barrett define la materia cristalina de la no cristalina en 1952, “*un Cristal se compone de átomos dispuestos en un modelo que se repite periódicamente en las tres dimensiones*”. El modelo a que se refiere esta definición puede consistir en un solo átomo, un grupo de átomos, una molécula o un grupo de moléculas.

La celda unitaria.- es el agrupamiento más pequeño de átomos que conserva la geometría de la estructura cristalina, y que al apilarse en unidades repetitivas forma un cristal con dicha estructura.

4.3.3.2 Punto, planos y direcciones en una celda unitaria

Puesto que la celda unitaria es la representación más simple de la estructura de un cristal, ésta es usada como la base para la definición de planos y direcciones dentro de un cristal.

Plano.- se designa por medio de símbolos llamados *índices de Miller* (hkl). Donde hkl son el inverso de las intersecciones del plano con los ejes x, y, z. Los planos se denotan mediante los índices dentro de paréntesis redondos, mientras que para una familia de planos se utiliza corchetes {hkl}.

Direcciones.- se denota por las coordenadas dentro de paréntesis cuadrados [hkl]. Las coordenadas resultan del unir el origen de la celda a una esquina o punto de la celda unitaria. La notación se hace de la combinación de los enteros más pequeños en lugar de las distancias reales, p.ej. [222] se denota como [111]. En el caso de que las coordenadas sean 1/2, 1/2, 1, hay que multiplicar por 2 para obtener [112].

4.3.4 Calorímetro diferencial de barrido (DSC)

La temperatura de gelatinización de los almidones fue estudiada usando un calorímetro diferencial de barrido (Q100, TA Instruments., NY), el cual fue calibrado con indio. Las muestras pesaron (10mg, harina más agua) en charolas de aluminio (900793.901, TA Instruments), adicionando agua desionizada en una relación 1:4 y dejándolas reposar una hora. Las charolas fueron selladas herméticamente y calentadas de 30° a 110° a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, usando una charola vacía como referencia. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

4.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando un diseño de bloques completos aleatorios, utilizando un análisis de varianza y la prueba de diferencia de medias de Tuckey.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Se presentará el estudio estructural del maíz QPM como materia prima y procesado por medio del método tradicional de nixtamalización, haciendo énfasis en las transformaciones fisicoquímicas que ocurren en la estructura del endospermo; formado por dos macro polímeros: amilosa y amilopectina, que se encuentran empacados de dos diferentes maneras, duro (Vítreo o cristalino) y suave (harinoso) los cuales influyen en los cambios fisicoquímicos del producto final.

5.1 Caracterización del grano

5.1.1 *Peso*

El peso de 1000 granos, sugiere el tamaño del grano de la variedad. Un peso bajo de 1000 granos corresponde a una muestra con gran porcentaje de granos pequeños, y por el contrario un peso alto, se obtiene cuando los granos son grandes. Se prefiere para procesamiento las variedades de peso mayor. El resultado obtenido para el peso del QPM H368C fue de 380.20 ± 1.40 mg. Arámbula y col. 1998, reportaron un peso para 1000 granos de 376.1 g para el maíz común y Jackson y col. en 1988, un rango de peso por cada 1000 granos, desde 289.4 g hasta 533.4 g, para las diferentes variedades de maíz. Como se puede ver, en el proceso de nixtamalización se pueden tener granos que presentan una variación de más del 50% en peso.

5.1.2 *Determinación dimensional del grano de maíz*

Los parámetros dimensionales del grano que incluyen largo (L), ancho (A) y espesor (E); son importantes para determinar el rendimiento en el producto final. En la tabla 5.1 se presentan los valores promedio del análisis dimensional del grano de maíz QPM H368C efectuado a 100 granos seleccionados aleatoriamente.

Tabla 5.1. Valor promedio del análisis de largo, ancho y espesor de maíz QPM-H368-C.

L (mm)	A (mm)	E (mm)
10.1 ± 1.01	9.00 ± 0.80	4.00 ± 0.20

Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar, (n=100)

En la actualidad no existen en la literatura reportes de estos parámetros de grano, ya que solo reportan el peso como una característica del grano. En este trabajo se observó que no hay una variación significativa en el largo, ancho y espesor. Esto se puede atribuir a que los granos utilizados para nixtamalización fueron seleccionados mediante cribas, lo que les da uniformidad.

5.1.3 Distribución de las principales estructuras anatómicas del grano de maíz

En la tabla 5.2 se presentan los resultados de la determinación de la composición anatómica (morfológica) porcentual de las partes principales del grano de maíz. La norma oficial mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2002 reporta para la cofia < 2%, para el pericarpio <5.5% y para el germen <12%.

Tabla 5.2. Promedio de las estructuras anatómicas del maíz QPM-H368-C.

QPM			
Pericarpio (%)	Endospermo (%)	Germen (%)	Cofia (%)
7.10 ± 0.40	79.40 ± 0.80	12.20 ± 0.50	1.30 ± 0.10

Los valores representan el promedio ± la desviación estándar, (n=100)

El pericarpio es una de las estructuras anatómicas que va tener el primer contacto con el licor de cocimiento o nejayote, delimitando la difusión de agua y calcio al interior del grano. Este se elimina con la cocción alcalina y con el lavado del nixtamal, se desea que esta fracción sea la menor posible en la estructura del grano, disminuyendo las pérdidas de sólidos durante la cocción. Al tener este híbrido (QPM H-368) un 30% más de pericarpio de acuerdo con la norma oficial mexicana NMX-FF-034/1-SCFI-2002, donde nos da las características del grano para tratamiento térmico alcalino. La degradación de esta estructura sería a tiempos largos de reposo, pero encontramos cambios en los gránulos de almidón a menores horas deduciendo que hay degradación en algunas áreas del pericarpio, permitiendo la difusión de agua y calcio al endospermo. El producto final (masa y harina) puede resultar en propiedades positivas, en particular: proporcionaría fibra dietética (polisacáridos no digeribles en el tracto intestinal), además de llevarse la concentración de calcio principalmente en el pericarpio (Gutierrez y col., 2007).

En la elaboración de la harina nixtamalizada, la parte más importante del grano es el endospermo, por lo que se prefiere con más alto porcentaje de endospermo.

5.1.4 Dureza del grano

Una característica del grano que es muy importante en nixtamalización es la dureza, propiedad intrínseca del grano, vinculada a la presencia de endospermo córneo y espesor de pericarpio. Dependiendo de la dureza del maíz, se determina el tiempo de cocimiento (a mayor dureza, menor tiempo). Según la norma (NMX-FF-034/1-SCFI-2002) la dureza es la fuerza necesaria para su rompimiento.

Estas características agronómicas pueden tener una función importante en su utilización, la industria de la nixtamalización prefiere granos con endospermo duro (granos cristalinos) [De Sinibaldi y Bressani, 2001]. En el caso del grano de maíz QPM su dureza fue de 14.82 ± 1.34 Kg, valores similares a los reportados (17.5, 14.74 y 13.49 Kg) para diversos híbridos [López y col., 2004]. La dureza en el endospermo harinoso y corneo fue de 7.99 ± 1.24 Kg y 12.44 ± 1.11 Kg respectivamente.

El espesor de pericarpio fue de $87\mu \pm 0.03$, valores bajos en comparación con los reportados para otras variedades (entre 91.5 a 122 μ en promedio)[De Sinibaldi y Bressani, 2001]. Según estos datos, la degradación de esta estructura durante el proceso térmico alcalino reflejará cambios físicos drásticos, facilitando la entrada de agua y calcio a las estructuras más internas del grano durante la etapa de cocción y reposo. [Paredes-López y Saharopulos, 1983]

Del endospermo total, el $20.82 \pm 1.5\%$ lo constituye endospermo harinoso y el resto está formado por endospermo córneo, siendo el grano, semicristalino.

5.2 Microscopia electrónica de barrido de bajo vacío en gránulos de almidón

La micrografía 5.1 muestra un corte transversal de un grano de maíz nativo o crudo, es decir sin ningún tratamiento, se aprecian diversas estructuras, entre ellas, el pericarpio (P), endospermo (E) y la capa de aleurona (CA). También podemos apreciar la sub-aleurona o el endospermo periférico (EP), la matriz proteica (MP) que cubre a los gránulos de almidón (GA).

El endospermo total se observó en tres zonas para su evaluación con SEM: en el endospermo harinoso que se encuentra en la parte central del grano; el endospermo córneo que cubre al endospermo harinoso y el endospermo periférico o también llamada sub-aleurona, ya que es la parte más externa del endospermo.

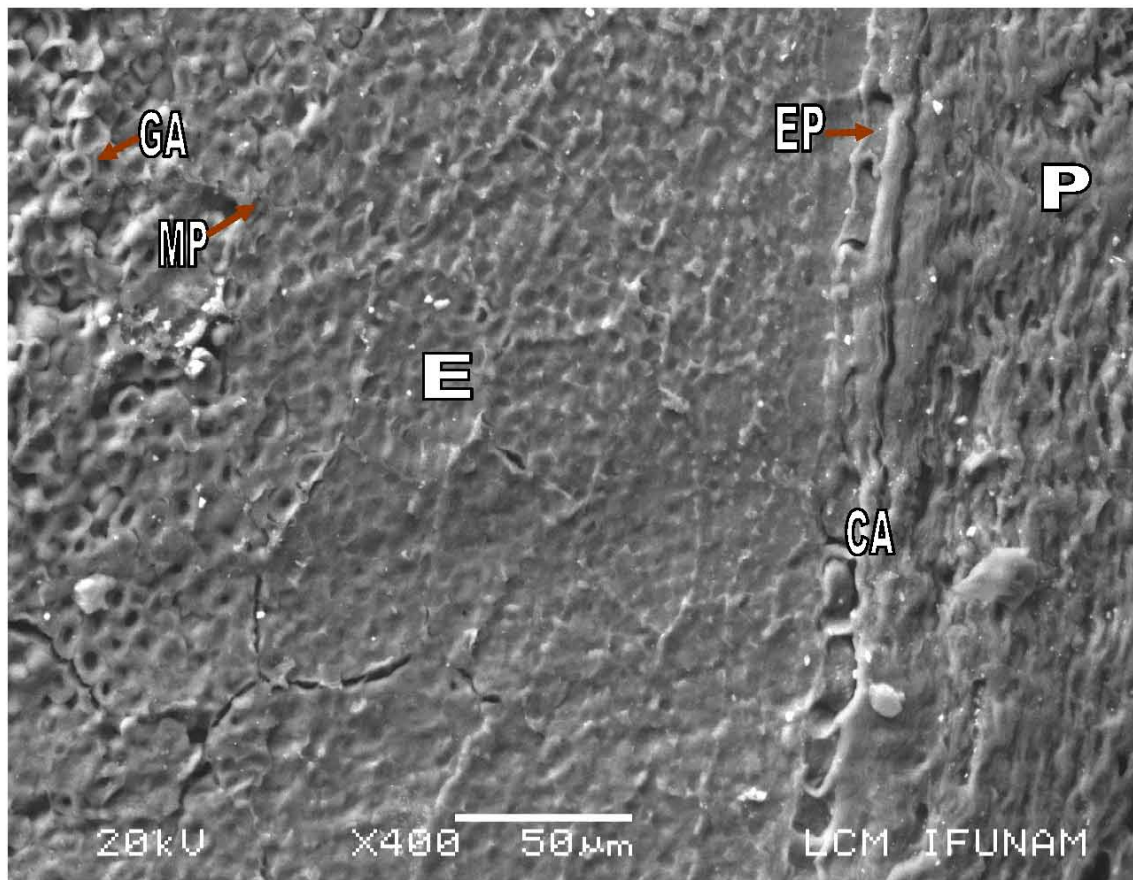


Figura 5.1 Micrografía de grano de maíz, 50 µm.

5.2.1 Morfología del endospermo H368-C sin tratamiento térmico-alkalino

Al examinar los gránulos de almidón (GA) en el grano crudo mediante LV-SEM, se observa que estos se encuentran rodeados de una matriz proteica (MP) y presentan una forma esférica en el endospermo periférico (Figura 5.2). Los gránulos en el endospermo córneo tiene forma poliédrica (Figura 5.3), y en el harinoso presenta forma esférica aproximadamente, con nódulos irregulares (Figura 5.4).

Cada estructura que conforma al endospermo es muy diferente, se visualiza que el grado de adhesión entre el almidón y la proteína es mucho mayor en el endospermo córneo que en el harinoso o periférico. Tal estructura compacta de empaquetamiento poliédrico explica la mayor resistencia del endospermo duro a las acciones mecánicas así como a la difusión del agua y calcio. En el caso del endospermo córneo, se ve cómo los gránulos de almidón se encuentran en paquetes de cientos de ellos (PGA).

En estas figuras se muestran: la matriz proteica (MP), los cuerpos proteicos (CP) y algunos gránulos de almidón (GA). La diferencia fundamental en el caso de almidón de maíz en el endospermo, es el factor de empaquetamiento y la forma. En el endospermo harinoso podemos observar la ausencia de cuerpos proteicos, así como mayor variación de forma y tamaño de los gránulos de almidón. El tamaño promedio para el almidón harinoso es de $7.36 \mu\text{m} \pm 3.45$, con una variabilidad entre $4 \mu\text{m}$ y $12 \mu\text{m}$; mientras en el endospermo periférico y córneo es $16.03 \mu\text{m} \pm 1.29$ y $15.62 \mu\text{m} \pm 3.12$, respectivamente.

5.2.2 Morfología del endospermo H368-C con tratamiento térmico alcalino en función del tiempo de reposo.

Durante el proceso de nixtamalización, principalmente se desprende el pericarpio del grano principalmente y durante el remojo hay difusión de agua y calcio hacia el endospermo. Por ello se observaron los cambios estructurales que ocurren durante este proceso durante el tiempo de reposo. Se ve afectado el empaquetamiento del gránulo de almidón por la difusión de agua y calcio en el grano de maíz.

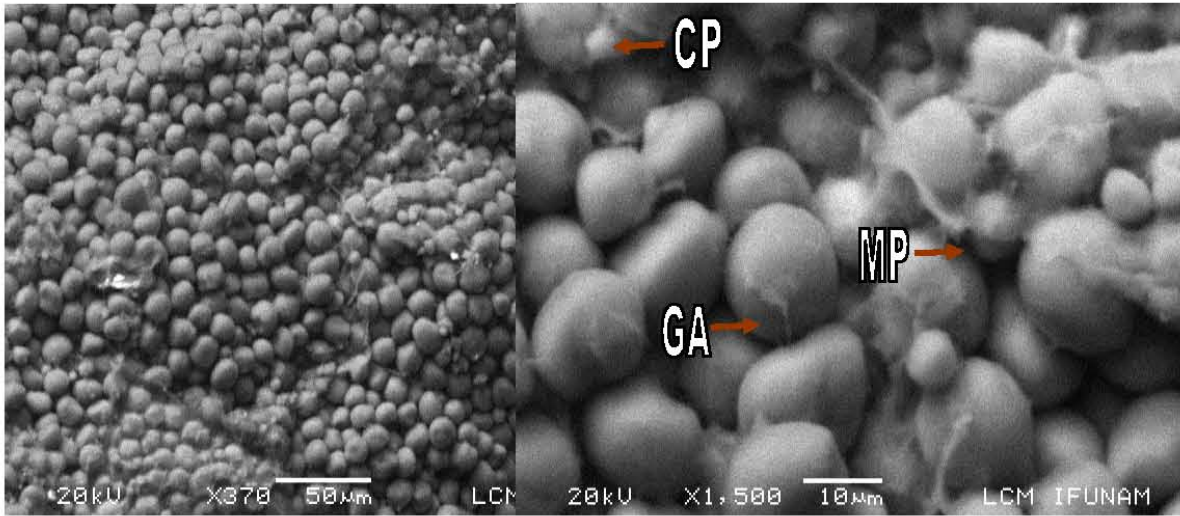


Figura 5.2 Micrografías del endospermo periférico, 50 y 10 μm. Estructura abierta y cuerpos proteicos.

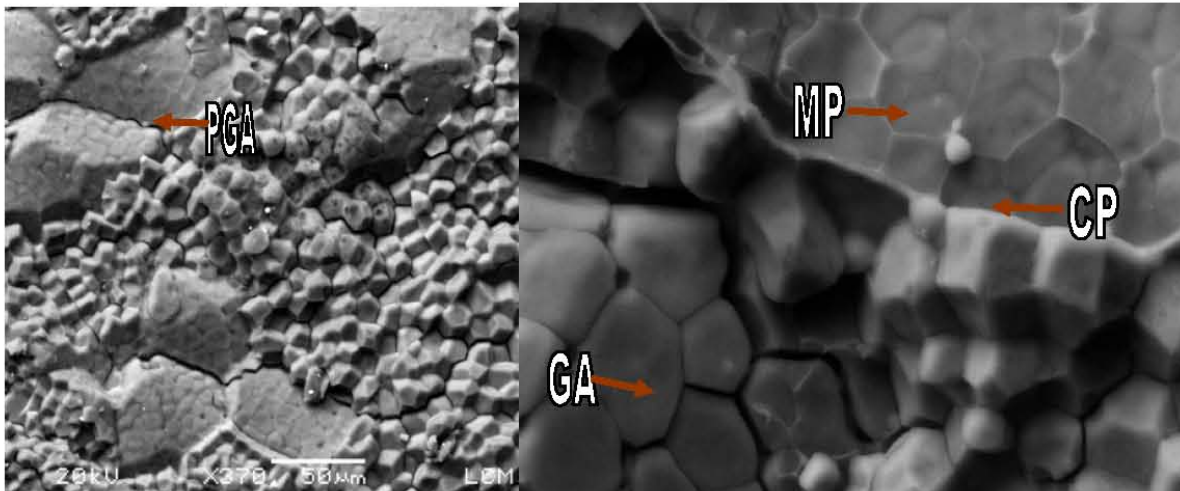


Figura 5.3 Micrografías del endospermo córneo, 50 y 10 μm. Estructura compacta y presencia de cuerpos proteicos.

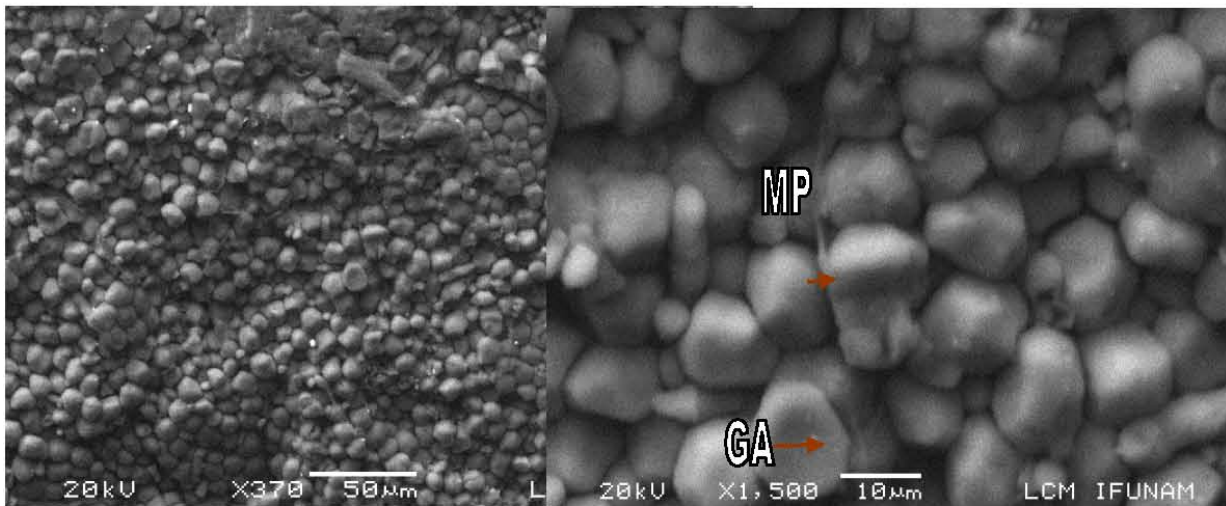


Figura 5.4 Micrografías del endospermo harinoso, 50 y 10 μm. Estructura abierta y ausencia de cuerpos proteicos.

En la primera hora de reposo no se observaron cambios estructurales significativos en la superficie de los gránulos de almidón en el endospermo periférico (figura 5.5). La matriz proteica (MP) se encuentra intacta, liberando algunos gránulos de almidón (GA) donde en su superficie se ha contraído un 35% del granulo del almidón nativo (figura 5.2), originando un hojuelo que exhibe una morfología parecida a las donas con un poro central (Po) en su superficie. Paredes-López y Saharopulos (1982) reportaron que esta característica de cavidad o hojuelo (Po) que presenta el gránulo de almidón mejora la digestibilidad del almidón por las enzimas, debido a una mayor accesibilidad a los gránulos del almidón causado por su morfología.

El endospermo córneo (figura 5.6), la matriz proteica (MP) se encuentra entera, sólo en la capa más externa comienza un desgaste haciendo la matriz proteica más delgada y una contracción que forma un poro central en la superficie del gránulo de almidón, similar al endospermo periférico.

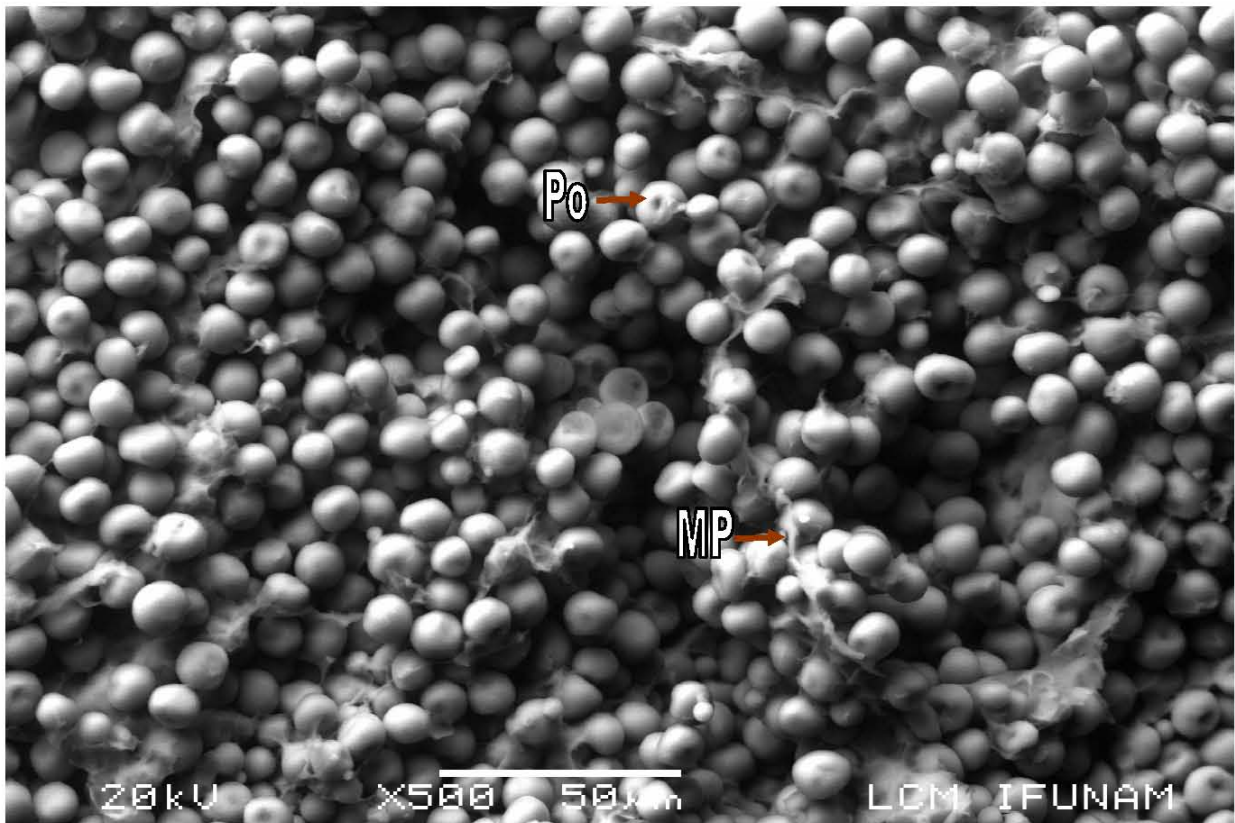


Figura 5.5 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo periférico con 1h de reposo en nejayote.

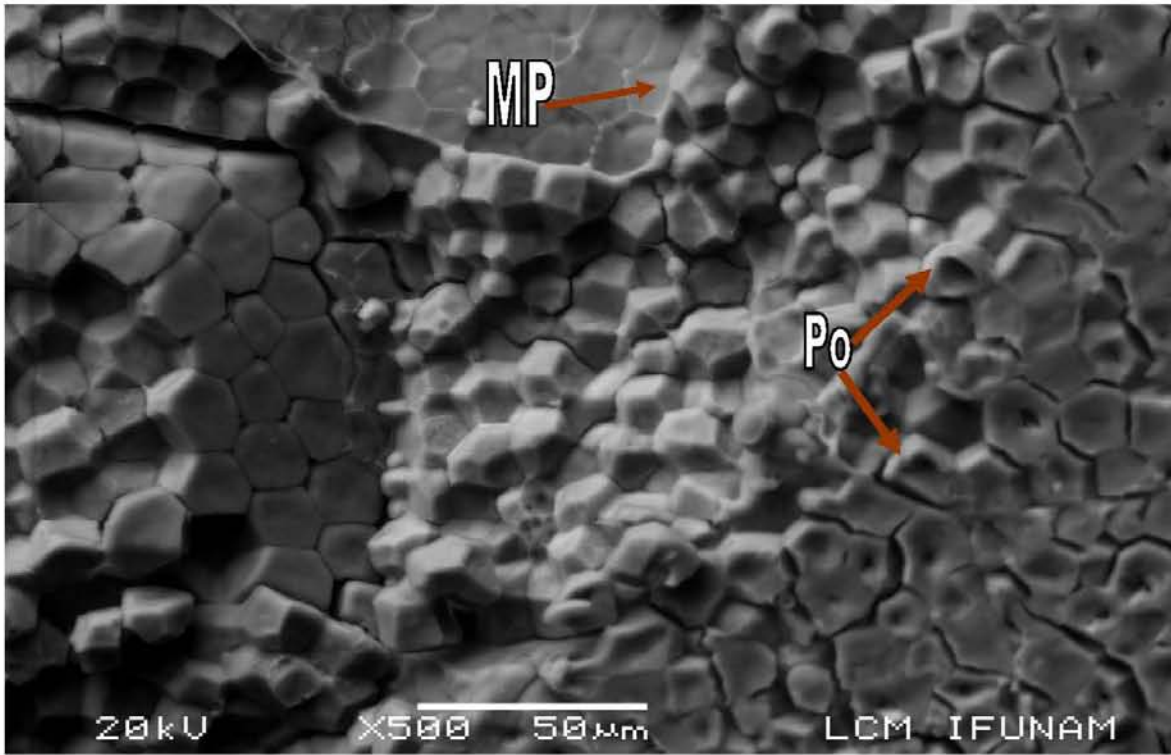


Figura 5.6 Micrografía de granulos de almidón en el endospermo corneo con 1h de reposo en nejayote.

Los granulos de almidón (GA) presentan hinchamiento principalmente en el endospermo harinoso del 70% (figura 5.7) y el córneo del 10%. Esto puede ser debido a que la difusión de agua al endospermo ocurre especialmente por la fracción del endospermo harinoso, donde probablemente se ha destapado el sello de la cofia. De acuerdo con Zazueta y col. (2002), donde la entrada de calcio y agua hacia el interior del grano también tiene lugar a través de la cofia directamente entre el germen y el endospermo.

Los cuerpos proteicos (CP) se observan principalmente en el endospermo córneo y periférico, pero no en el harinoso.

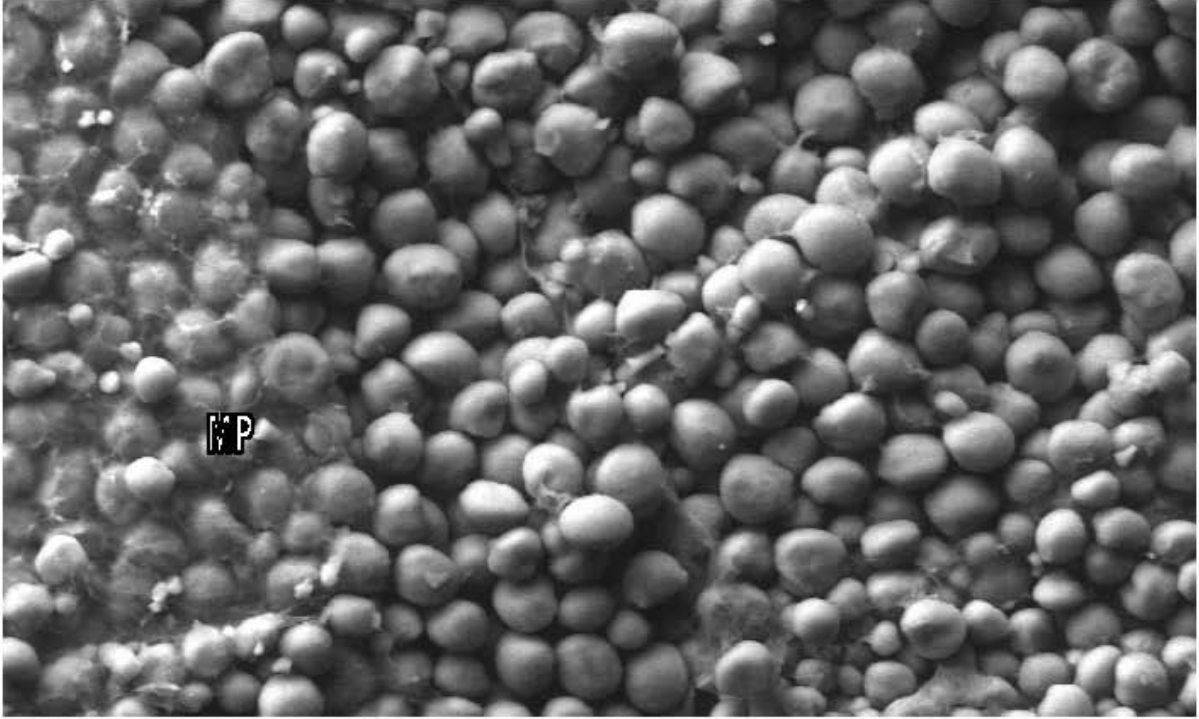


Figura 5.7 Micrografía de granulos de almidon en el endospermo harinoso con 1h de reposo en nejayote.

A las tres horas de reposo se observaron cambios muy apreciables en los granulos de almidon, la cantidad de los hojuelos o poros (Po) en la superficie han incrementado en el endospermo córneo y periférico (figura 5.8 y 5.9). Se infiere que en el centro del granulo del almidon es donde se concentra la mayor cantidad de energía necesaria cuando se calienta formando las donas, y es por ello que al seguir calentando, los granulos explotan desde el centro. El efecto de los lípidos antes y después de la gelatinización es dar estabilidad a los granulos formando complejos que impedirán que el granulo explote bruscamente. Entonces, esto evita que se forme una pasta y dé lugar a morfologías en forma de estrella como veremos más adelante.

En la figura 5.9, la matriz proteica se va solubilizando en la parte más externa del pericarpio córneo y los granulos de almidon se ven parcialmente gelatinizados, perdiendo su forma y liberándose de la matriz proteica que los rodea.

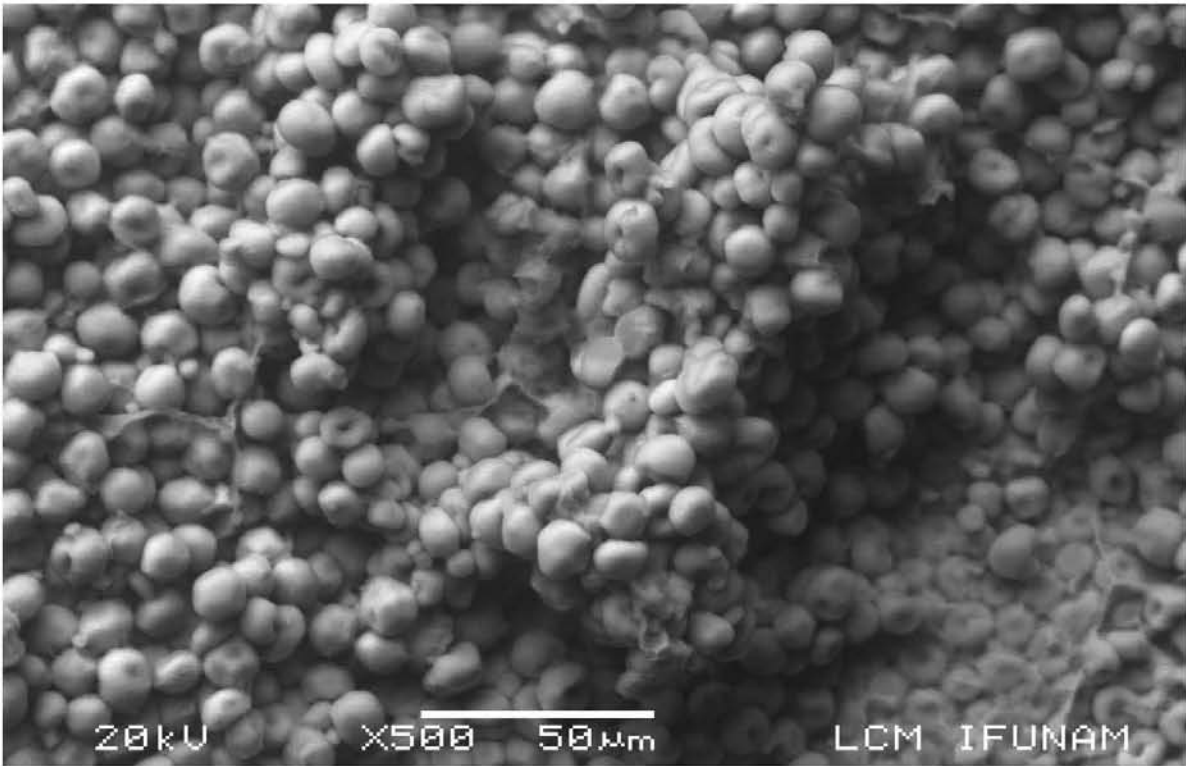


Figura 5.8 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo periférico con 3 h de reposo en nejayote.

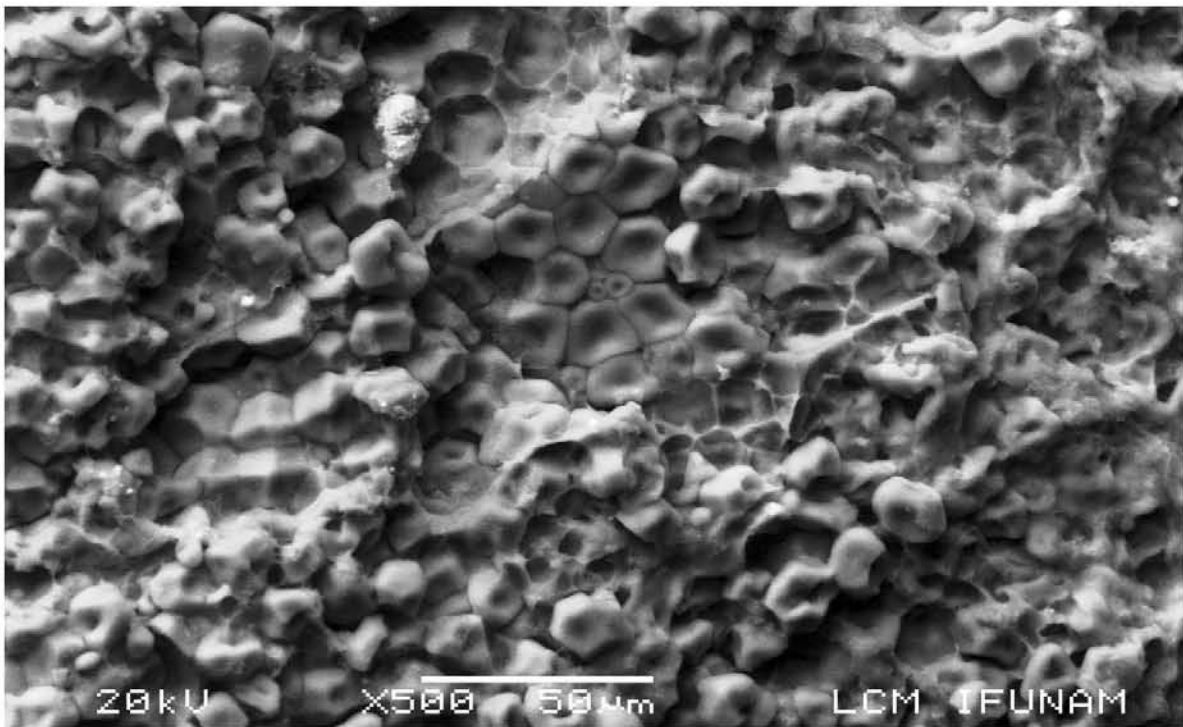


Figura 5.9 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo corneo con 3 h de reposo en nejayote.

En el endospermo harinoso (Figura 5.10), se encontró ligeramente hinchados los gránulos de almidón, sobre todo los de mayor tamaño. Se empieza a percibir acumulación de gránulos blancos (GB), que corresponden a compuestos de calcio en esta estructura y la matriz no muestra cambios físicos.

Concluyendo durante la primera hora, no solo hay difusión de agua y calcio al pericarpio y germen [Zazueta y col., 2002], sino que también hay difusión agua y calcio simultáneamente en el endospermo harinoso a través de la cofia. A tres horas se observan cambios significativos en el endospermo, estos cambios no son homogéneos debido a que encontramos gránulos parcialmente gelatinizados en el endospermo córneo, hinchados en el harinoso y en el periférico se observaron cambios en su superficie.

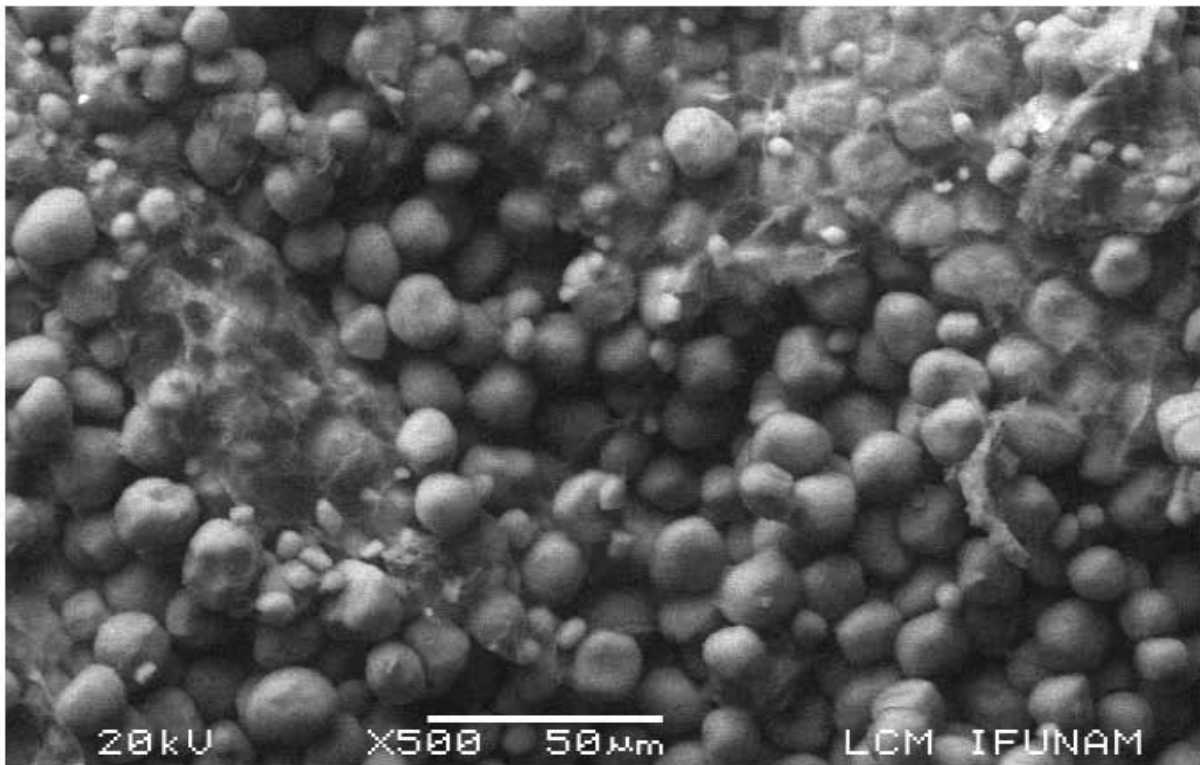


Figura 5.10 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo harinoso con 3 h de reposo en nejayote.

Al seguir sumergido en el nejayote (o licor de cocimiento) a las siete horas, los cambios en la morfología se asocian gránulos parcialmente gelatinizados. En el caso del endospermo periférico y harinoso, la matriz comienza a verse en trazos mezclados con los gránulos de almidón (figura 5.11 y 5.13). El endospermo córneo (figura 5.12) comienza a perder su morfología poliédrica y aparecen morfologías de donas en forma general. Aun se ve que la matriz proteica contiene los gránulos de almidón.

A esta hora de reposo se ve muy poca acumulación de gránulos blancos (GB), especialmente en el endospermo harinoso y córneo.

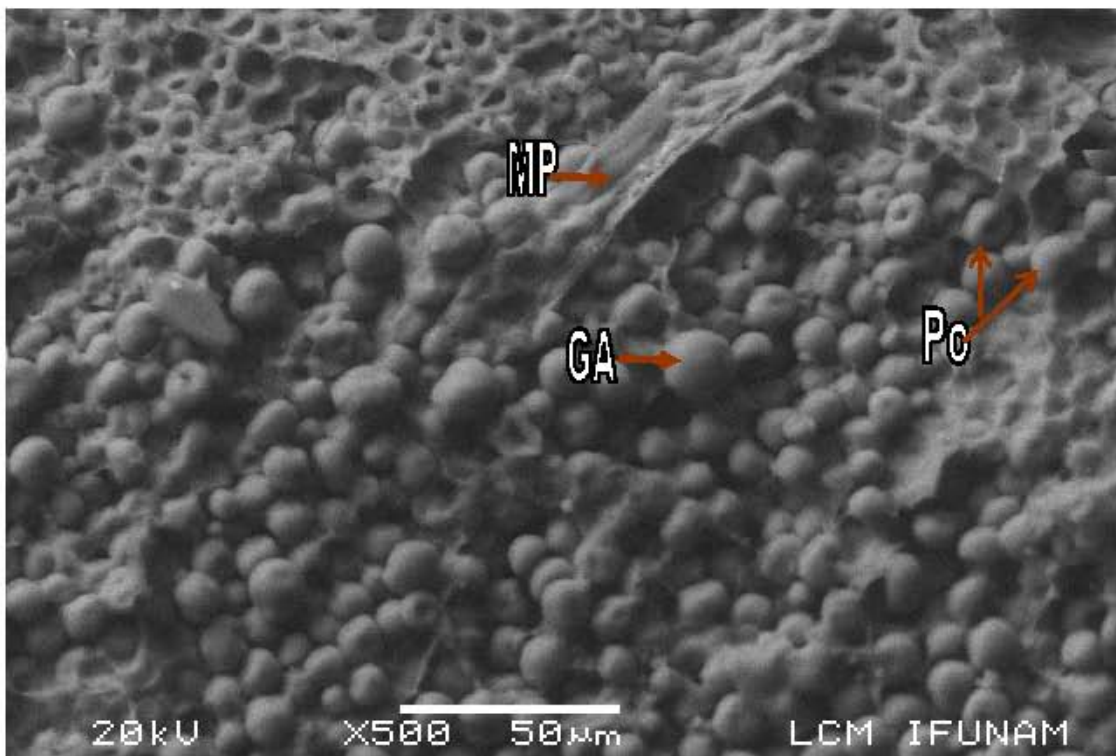


Figura 5.11 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo periférico con 7 h de reposo en nejayote.

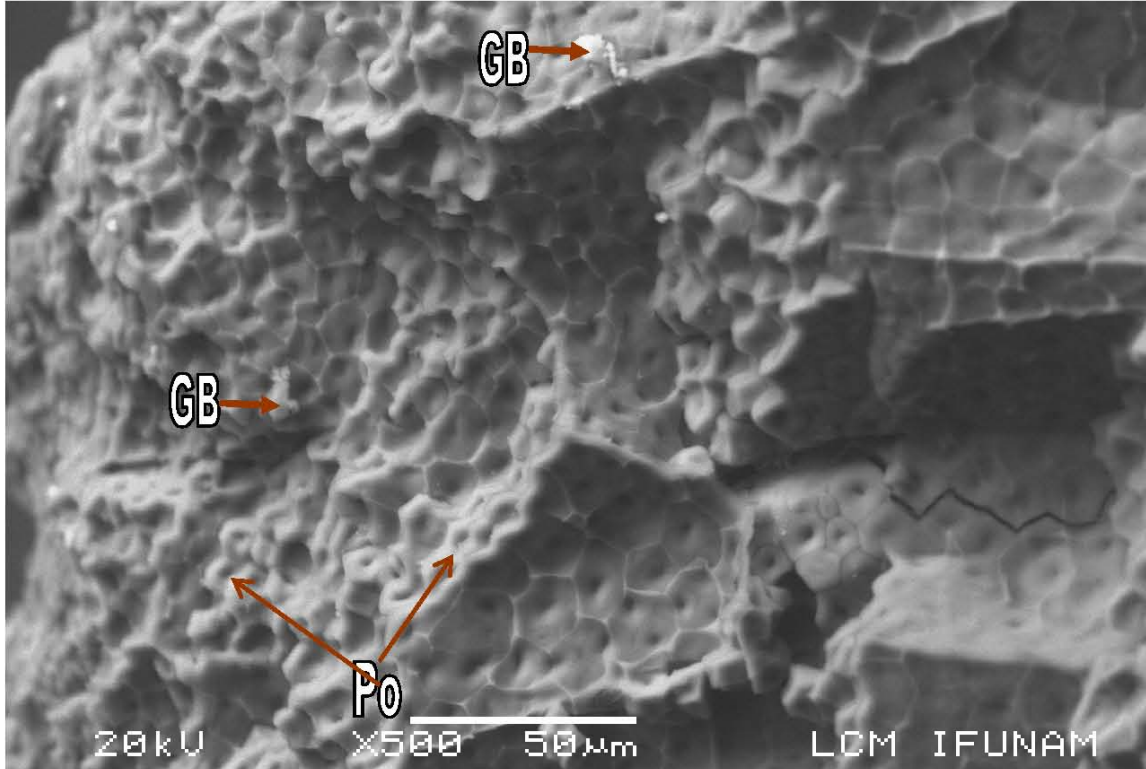


Figura 5.12 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo corneo con 7 h de reposo en nejayote.

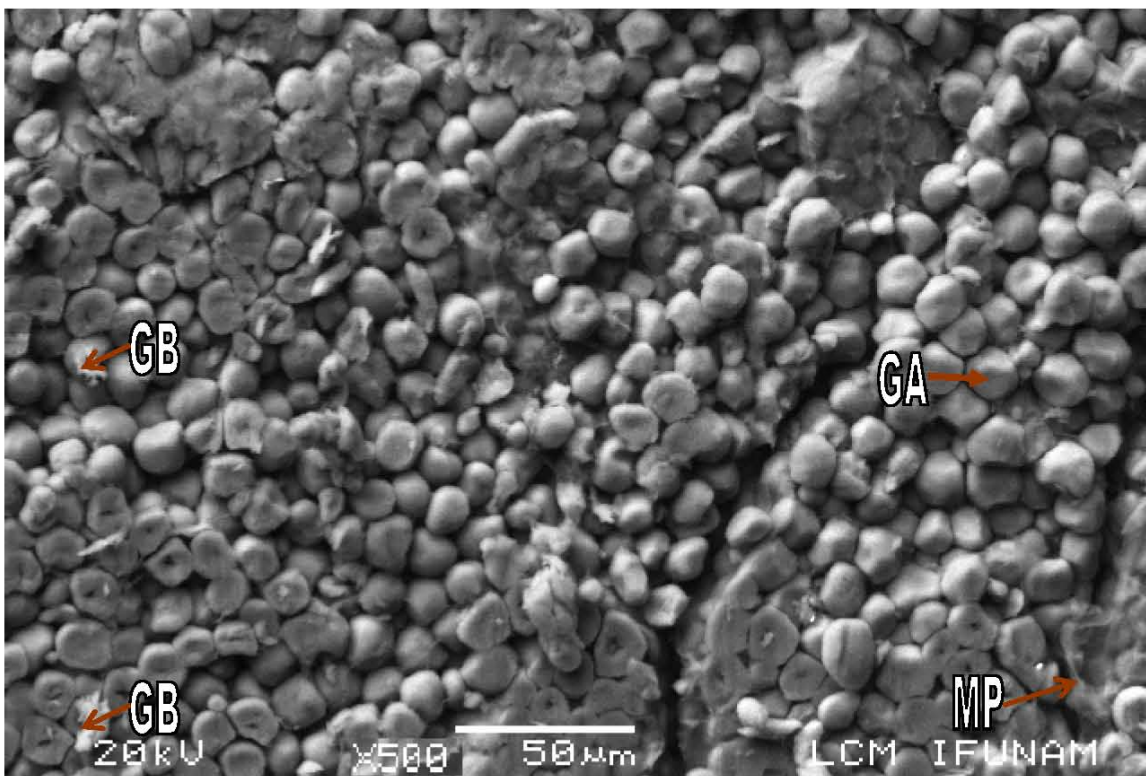


Figura 5.13 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo harinoso con 7 h de reposo en nejayote.

A esta hora de reposo se ve muy poca acumulación de gránulos blancos (GB), especialmente en el endospermo harinoso y córneo.

A las nueve horas de reposo, los cambios morfológicos son drásticos. Observamos túneles (T) en la figura 5.14, que se han formado en algunas áreas de la superficie del pericarpio y capa de aleurona, dando entrada a la difusión de calcio y agua a todo el endospermo, pero no en la suficiente cantidad para provocar la completa gelatinización. Esto sugiere que el pericarpio se ha perdido o degenerado en el nejayote y que la capa de aleurona se ha destruido en algunas partes del grano formando pozos o túneles que conectan con el endospermo.

En el caso del endospermo córneo ya no se perciben los paquetes de gránulos de almidón (figura 5.15) y la acumulación de gránulos blancos (GB) se encuentran en las tres fracciones del endospermo, especialmente en el harinoso (figura 5.16).

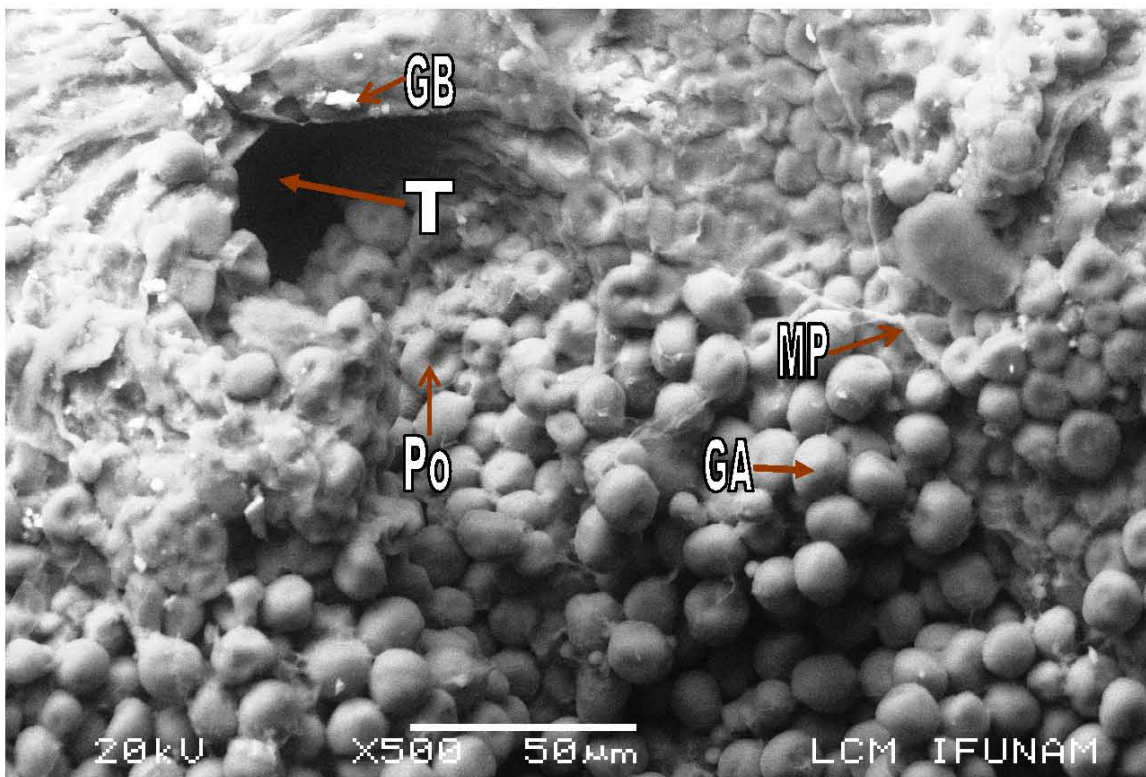


Figura 5.14 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo periférico con 9 h de reposo en nejayote.

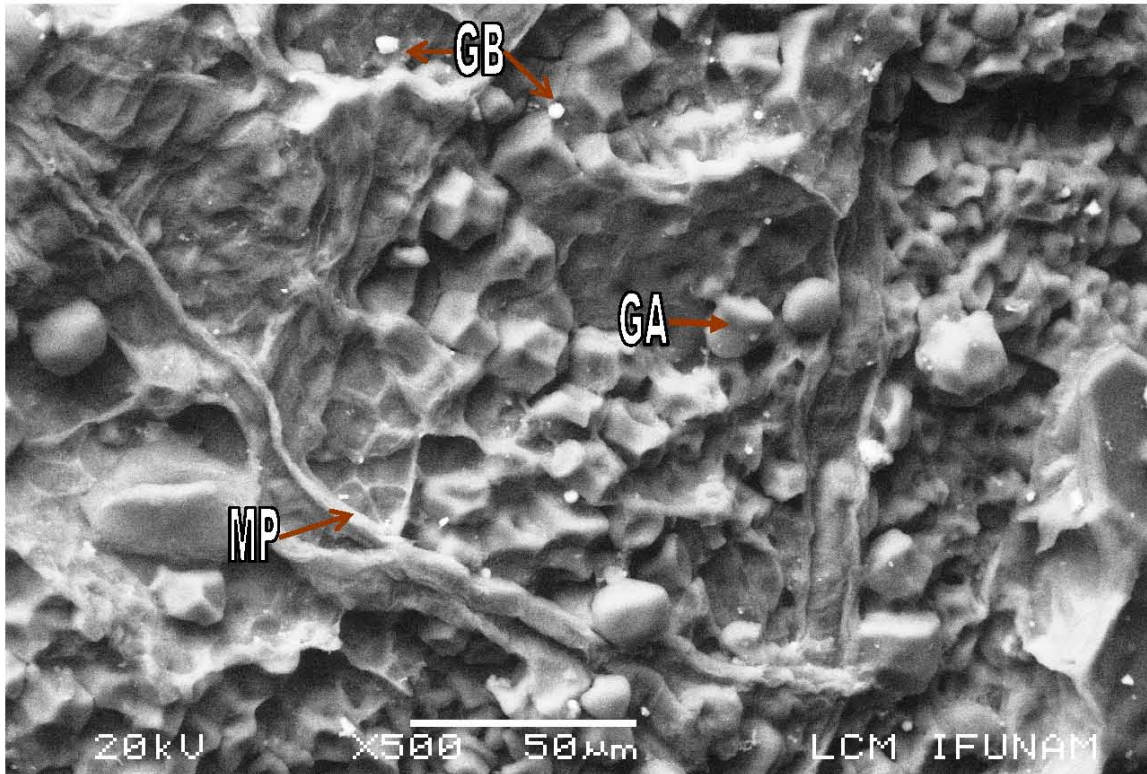


Figura 5.15 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo corneo con 9 h de reposo en nejayote.

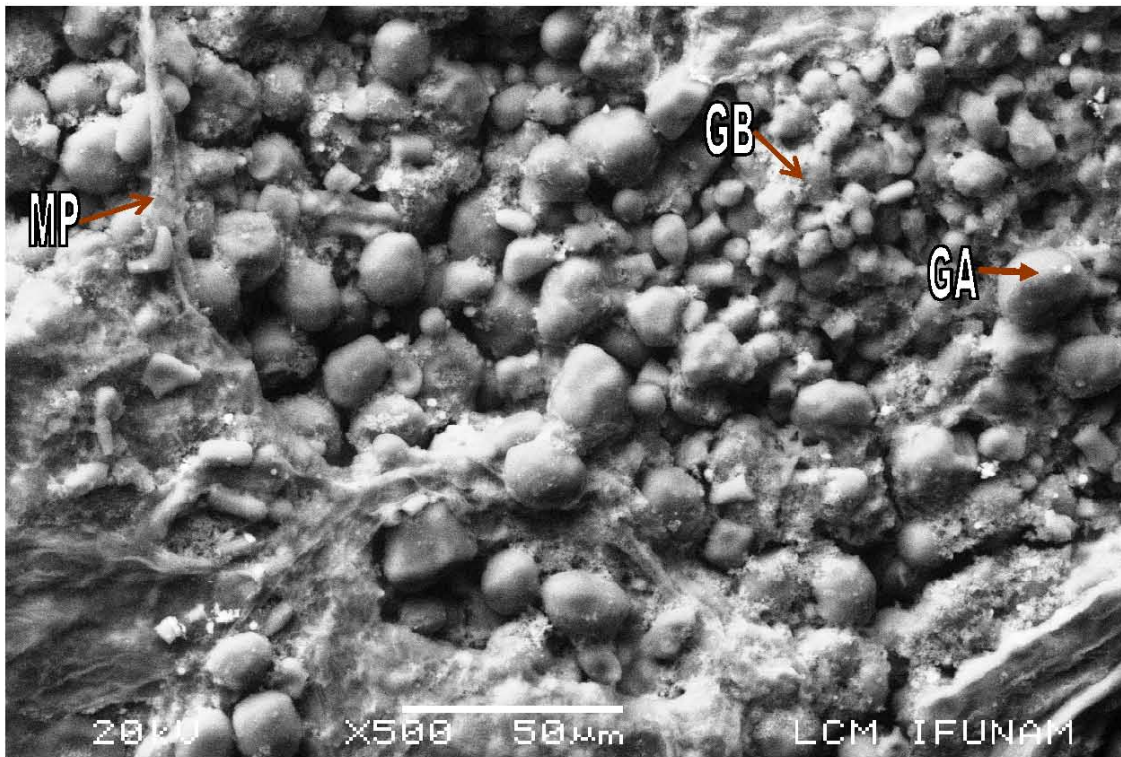


Figura 5.16 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo harinoso con 9 h de reposo en nejayote.

En los granos tratados con once horas de reposo, los gránulos de almidón muestran hinchamiento. La morfología de dona se sigue mostrando en el endospermo periférico y córneo (Figura 5.17 y 5.18); presentando algunos gránulos de almidón con morfología de estrella. La matriz proteica ya no contiene al gránulo de almidón sino que lo encontramos en forma de trazos o fusionándose con ellos. Los gránulos blancos (GB) los encontramos en forma general en las tres fracciones del endospermo. En la figura 5.19, se observa como el calcio envuelve a los gránulos de almidón del endospermo harinoso completamente.

Gómez y col. (1989), muestra los cambios estructurales de maíz nixtamalizado con doce horas de reposo, con la técnica de microscopía electrónica de barrido, indicando que el cocimiento y el reposo durante la nixtamalización, en el endospermo córneo y periférico, los gránulos de almidón fueron parcialmente gelatinizados y permaneciendo juntos en paquetes como se ve en la figura 5.3, del endospermo córneo o duro.

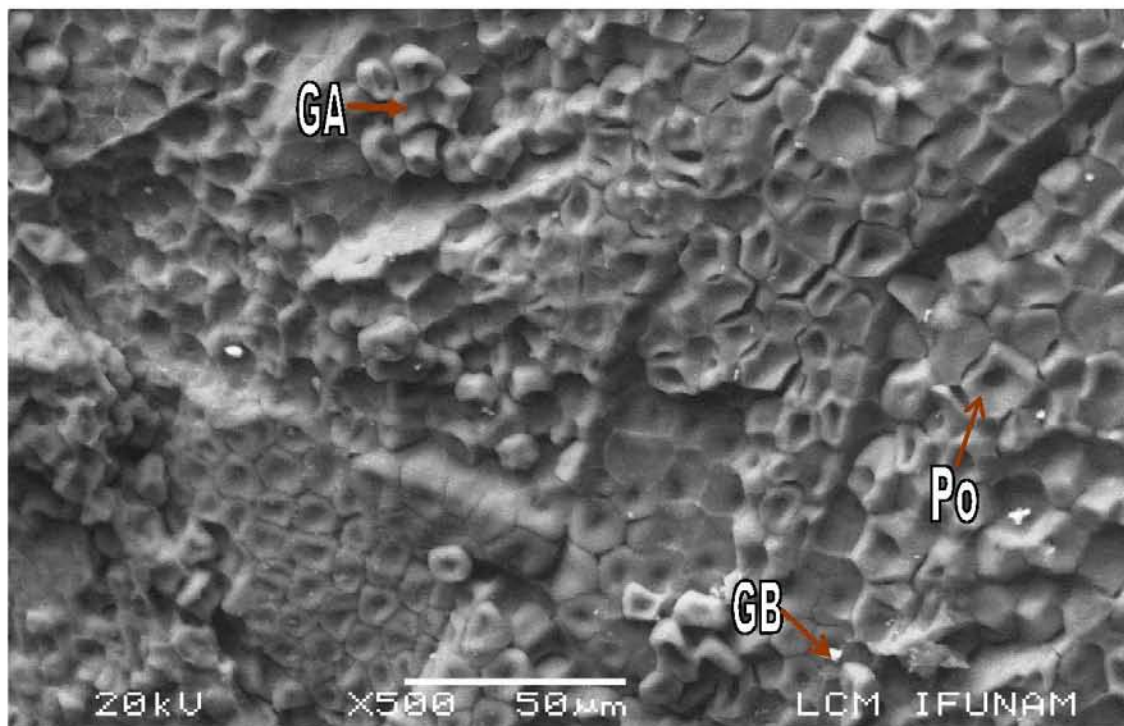


Figura 5.17 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo periférico con 11 h de reposo en nejayote.

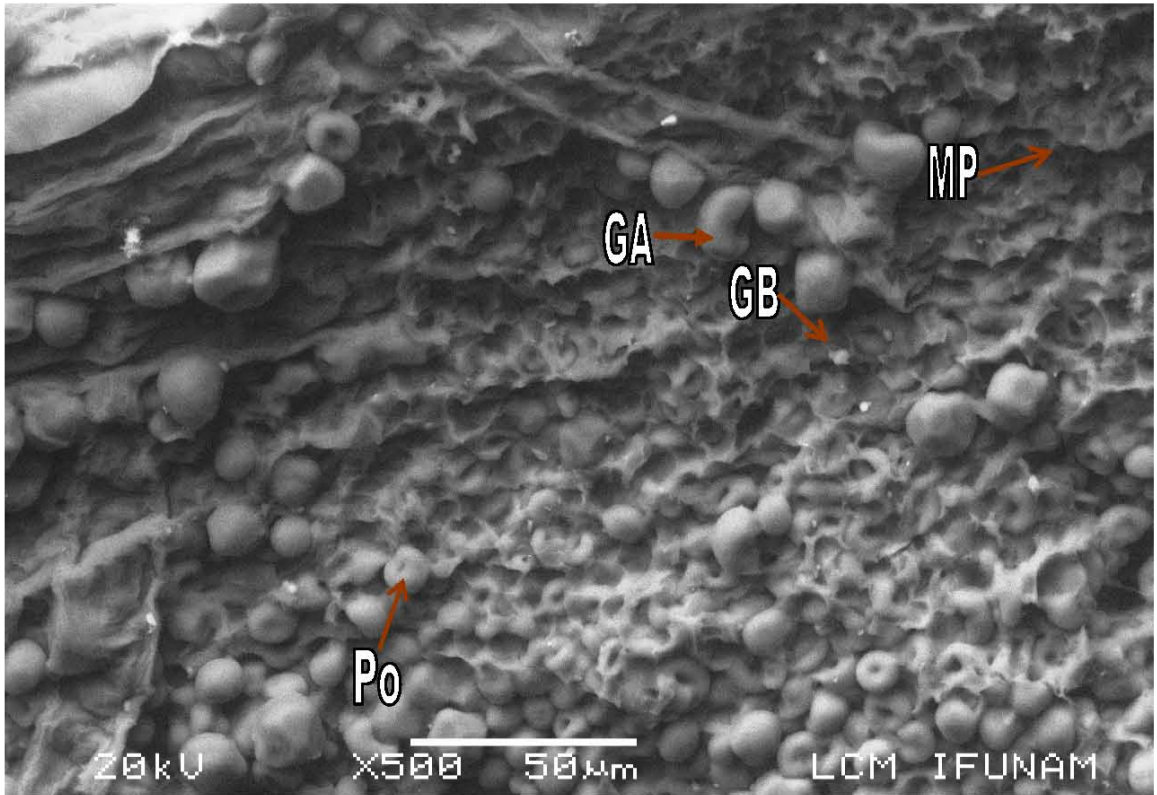


Figura 5.18 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo corneo con 11 h de reposo en nejayote.

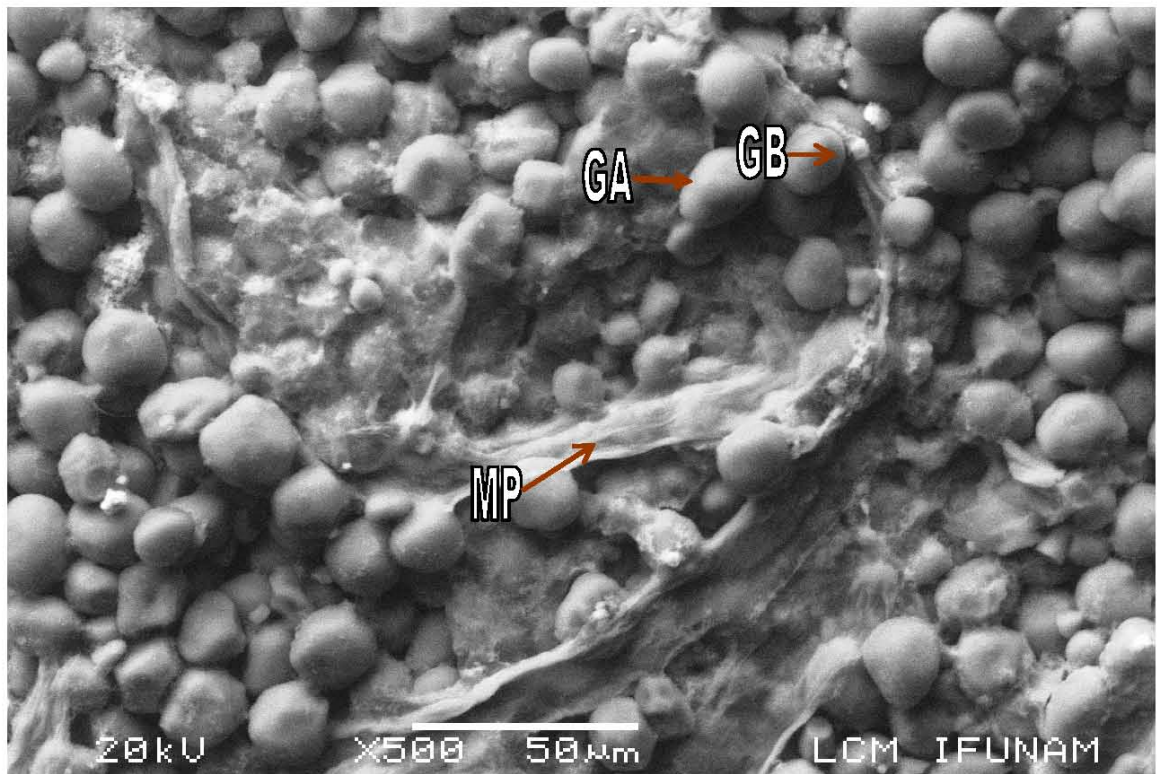


Figura 4.19 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo harinoso con 11 h de reposo en nejayote.

Sin embargo a las quince horas los cambios son radicales los gránulos de almidón están hinchados y totalmente libres. Con la finalidad de apreciar la morfología de los gránulos de almidón en las tres fracciones se ha aumentado tres veces las micrografías, en la figura 5.21 vemos la morfología de estrella (E), de un gránulo muy hinchado. En el caso del endospermo periférico vemos como se ha solubilizado la matriz proteica, fusionándose con los gránulos de almidón (figura 5.20), encontrando gránulos de almidón totalmente libres.

El reposo muy prolongado gelatiniza mayor cantidad de gránulos de almidón, formando una pasta difícil de manejar en la elaboración de productos finales como la tortilla. En la figura 5.22 se observa como se han adherido varios gránulos de almidón formando pequeños agregados.

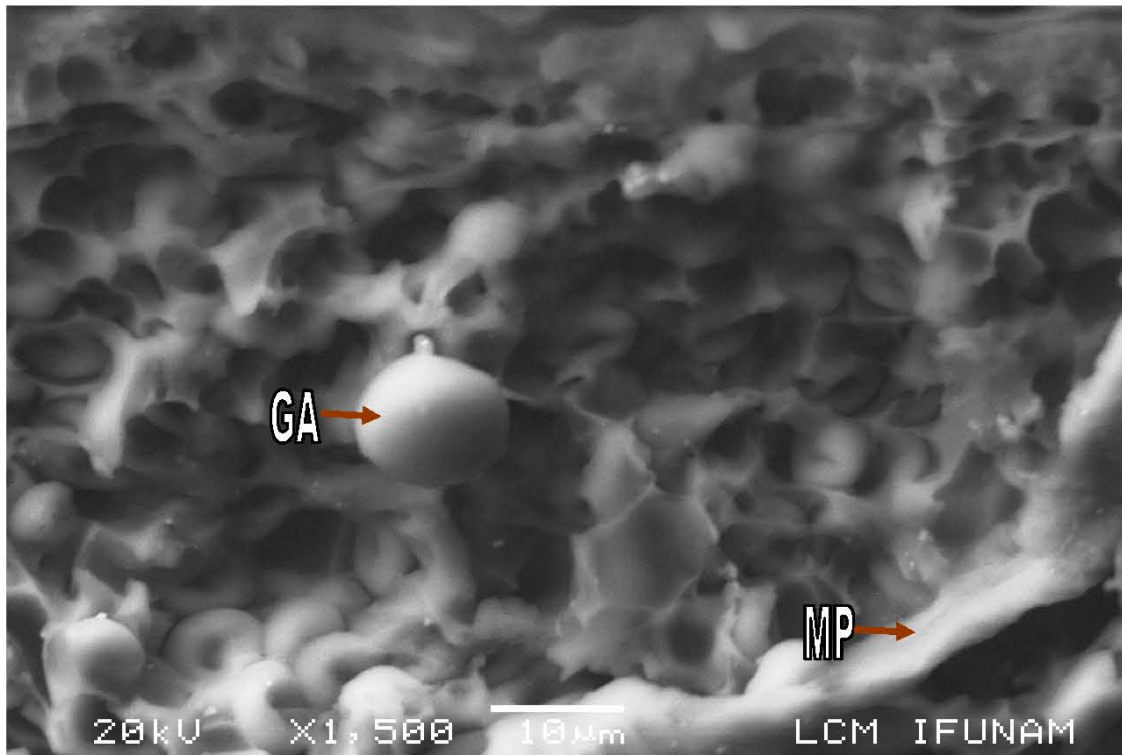


Figura 5.20 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo periférico con 15 h de reposo en nejayote.

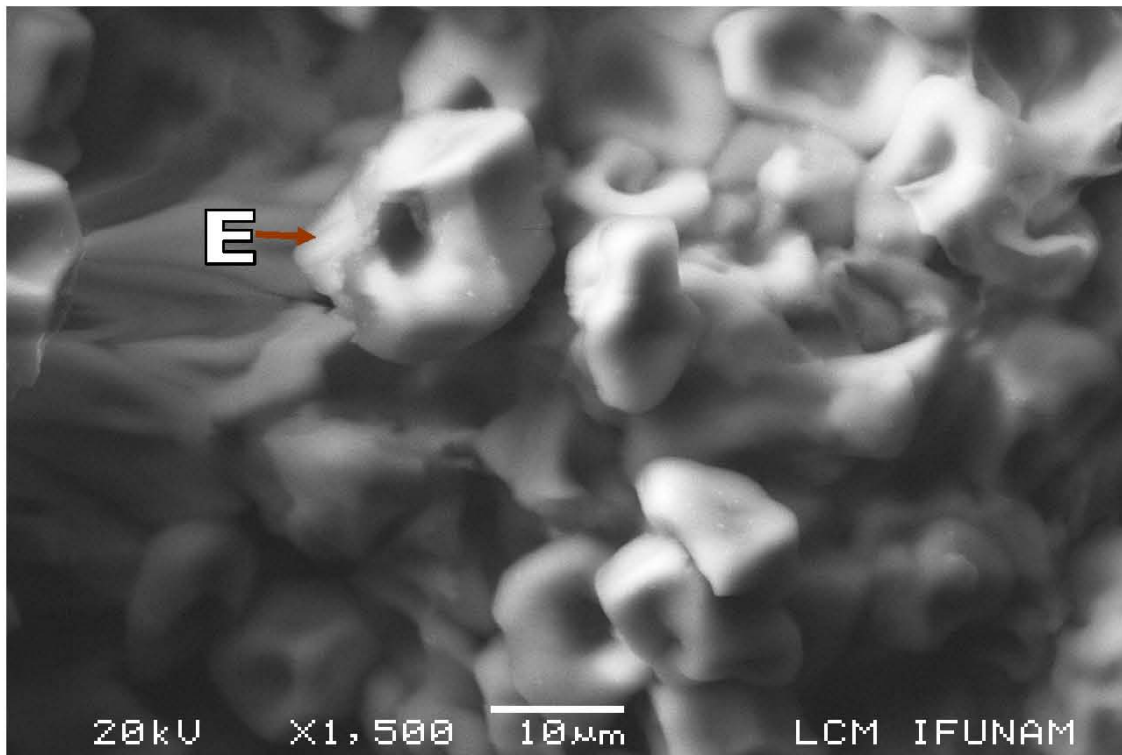


Figura 5.21 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo corneo con 15 h de reposo en nejayote.

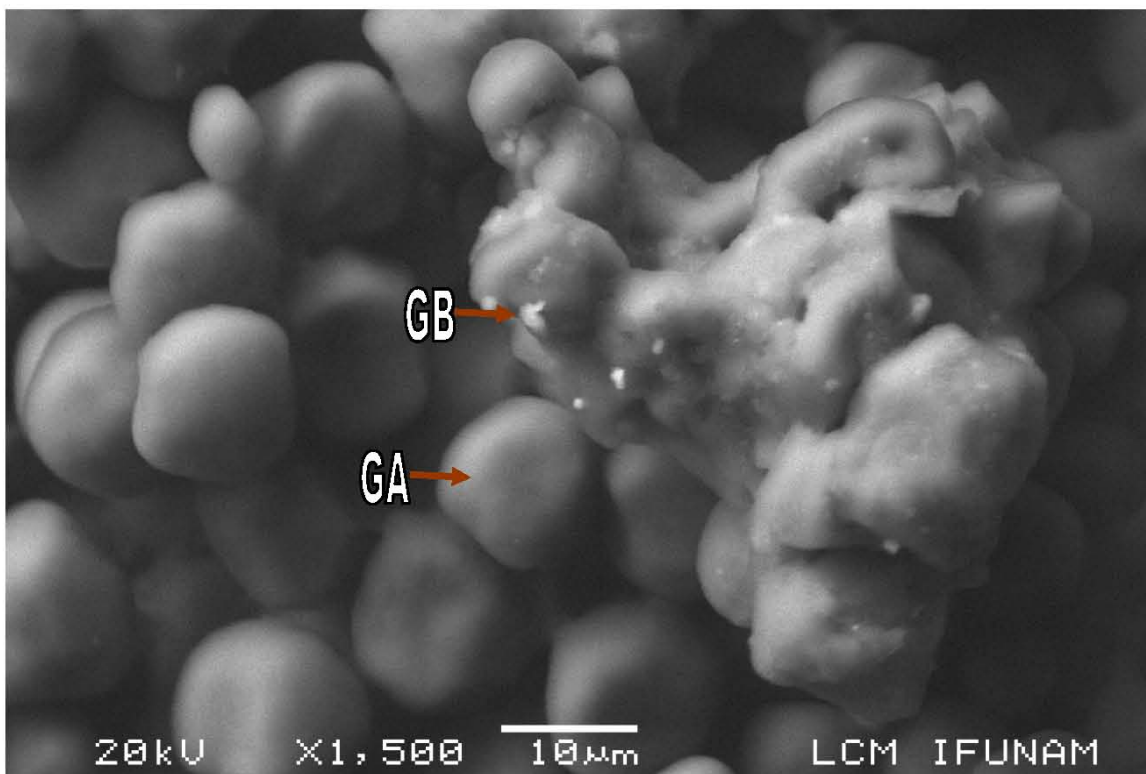


Figura 5.22 Micrografía de gránulos de almidón en el endospermo harinoso con 15 h de reposo en nejayote.

5.3 Propiedades estructurales de biopolímeros derivados del maíz: amilosa y amilopectina.

En esa sección se discutirán las transformaciones estructurales que sufren los biopolímeros que conforman el almidón, como son la amilosa y amilopectina, cuando se someten a tratamiento térmico y con tratamiento térmico alcalino. Es de recalcar que en la literatura y en la base de datos JCPDS (Internacional Centre for Diffraction Data), existe solamente reportado y aceptado la estructura de la amilosa, que fue reportada por Ann Imberty en el año 1988.

5.3.1. Estudio de patrones de difracción de rayos X en almidón

Se realizaron medidas de difracción de rayos X en amilosa, amilopectina y almidón comercial (Sigma Aldrich), con el fin de obtener espectros característicos de estas macromoléculas que permitan hacer un seguimiento y un comparativo de los cambios estructurales en el endospermo como producto del tratamiento térmico-alcalino.

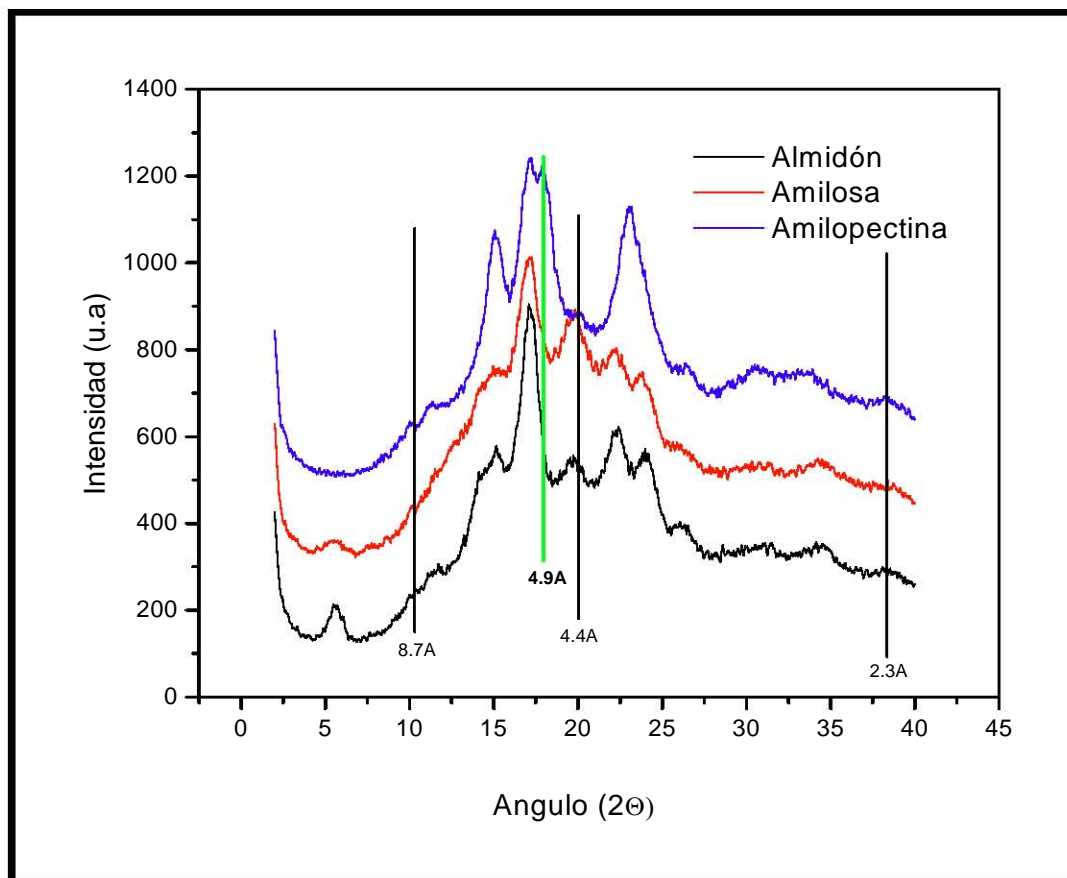


Figura 5.23. Espectros de difracción de rayos x de amilosa, amilopectina y almidón.

En la figura 5.23 se muestran los espectros de difracción XRD de amilosa, amilopectina y almidón comercial. El espectro de difracción de rayos X de la amilosa se observa que es similar al patrón normal tipo B del almidón proveniente de los tubérculos, la estructura cristalina que presenta, posiblemente sea debida a pequeñas ramificaciones en su estructura. Mientras que el espectro de la amilopectina es similar al patrón de rayos X de los cereales tipo A (figura 2.8). Es evidente que la amilopectina es más cristalina que la amilosa, lo que confirma que la parte cristalina del almidón proviene mayoritariamente de la contribución de la amilopectina. En los difractogramas anteriores se muestran tres picos cristalinos que no son característicos de la amilosa y una reflexión en $d=4.4 \text{ \AA}$, justamente donde cae la reflexión más intensa del almidón tipo V (figura 2.8). (Zobel y col., 1988)

Utilizando la metodología de Rodríguez y col. (1996) y de acuerdo a la sección de metodología en el capítulo IV, se determinó la cristalinidad relativa de cada macromolécula. Como se puede apreciar en la figura 5.24, la cristalinidad en el gránulo de almidón se puede atribuir principalmente a la amilopectina, resultado está de acuerdo con los datos reportados. (Oates, 1997)

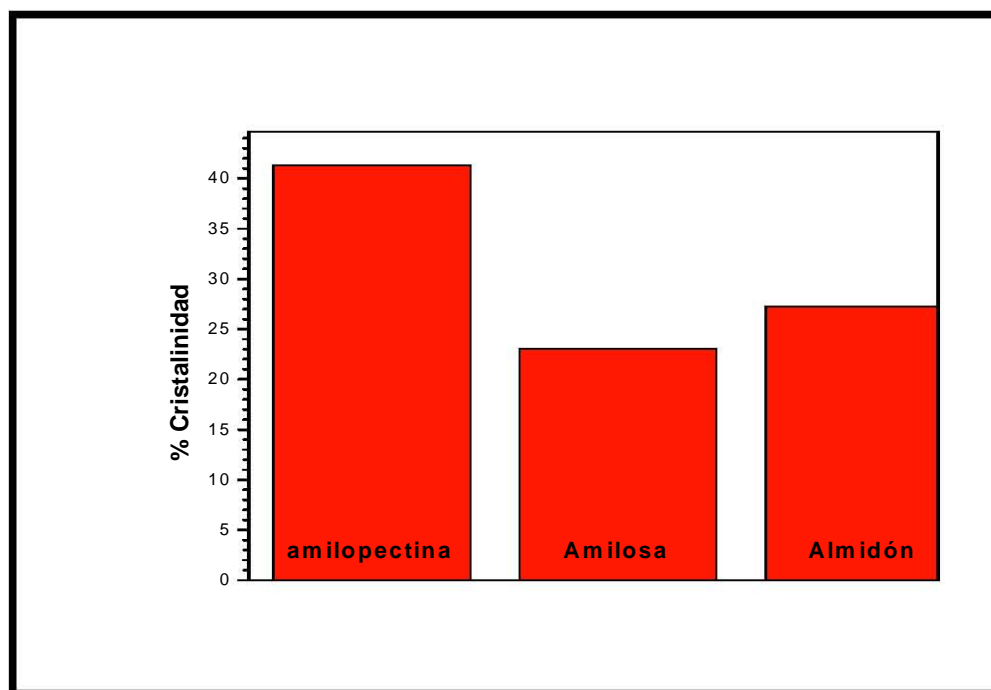


Figura 5.24. Cristalinidad (%) de amilosa, amilopectina y almidón.

5.3.2 Estructura cristalina del endospermo sin tratamiento térmico alcalino

La relación de endospermo harinoso y córneo es un parámetro muy importante en el caso del proceso de nixtamalización, por lo que se realizaron pruebas de rayos X a las diferentes fracciones del endospermo sin tratamiento alguno (figura 5.25). Se observó que el endospermo córneo es más cristalino, ver el inserto en la figura 5.25 y muestra el patrón característico de los cereales (figura 2.8), muy al contrario del endospermo harinoso que básicamente es amorfo, pero muestra tres picos cristalinicos característicos de la amilosa: en $d= 3.8$; 4.9 y 5.8 Å. Rodríguez y col. (2001) muestran un espectro de rayos X de endospermo similar al endospermo córneo pero no especifican indica la variedad, esto nos indica que es semi-cristalino o cristalino al predominar el endospermo córneo.

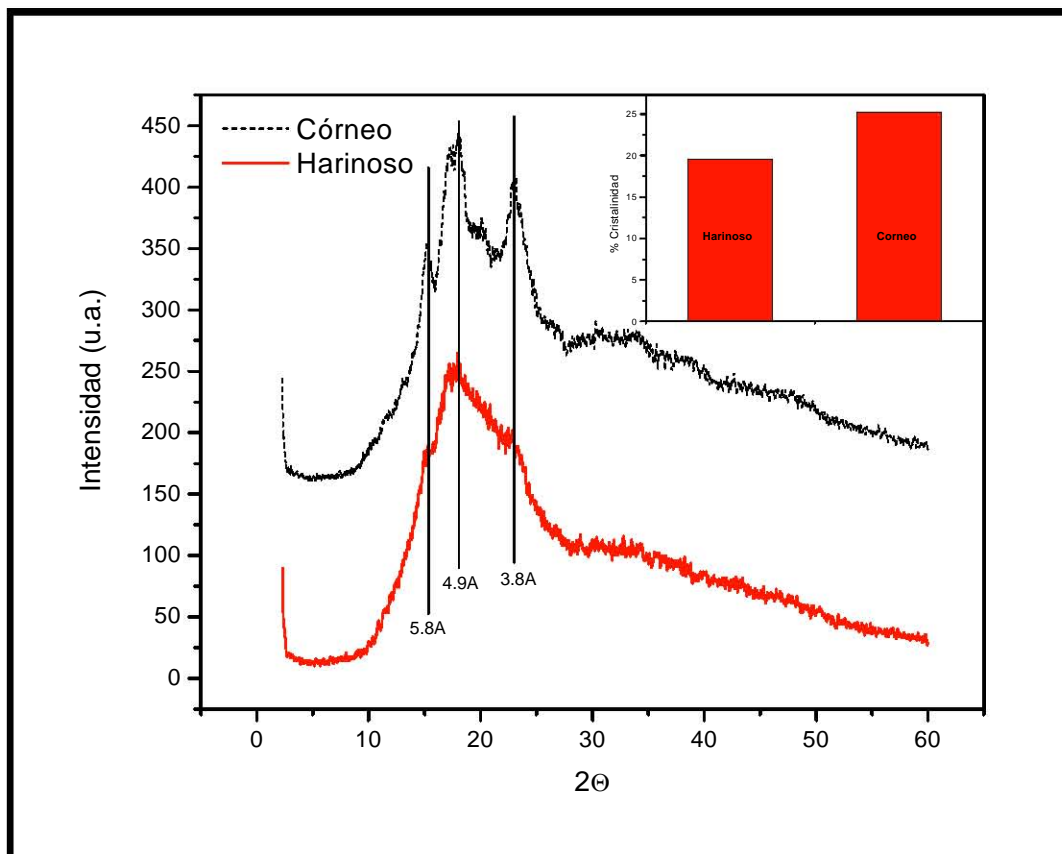


Figura 5.25 Espectros de difracción de rayos x de endospermo córneo y harinoso.

Para estudiar los cambios fisicoquímicos y principalmente las transformaciones estructurales en el endospermo, es necesario hacer un estudio estratificado. En la figura

5.26 se muestran los espectros de difracción de rayos X del primer raspado de la capa más externa del endospermo (10%), segundo raspado (siguiente 10%) y el 80% restante del endospermo sin tratamiento térmico-alcálico. Se ve un patrón de difracción característico del tipo A y similar al difractograma del endospermo córneo (figura 5.25). Esto puede ser atribuido a que el primero y segundo raspado corresponden al endospermo córneo y el 80% restante tiene el 60% del endospermo córneo. En esta figura en comparación con la figura 5.23, los picos del difractograma muestran que el endospermo córneo está formado principalmente por amilopéctina aunque presenta también de manera secundaria los picos de difracción característicos de la amilosa, de acuerdo al reporte de Ann Imberty y col. (1988). Para cada uno de los picos cristalinos se indica el espaciamiento inter-planar correspondiente en $d=3.8$; 4.4 ; 4.9 ; 5.1 y 5.8 Å característicos de amilosa. Cabe recalcar como se mencionó anteriormente, que no existe un patrón de difracción característico de la amilopéctina.

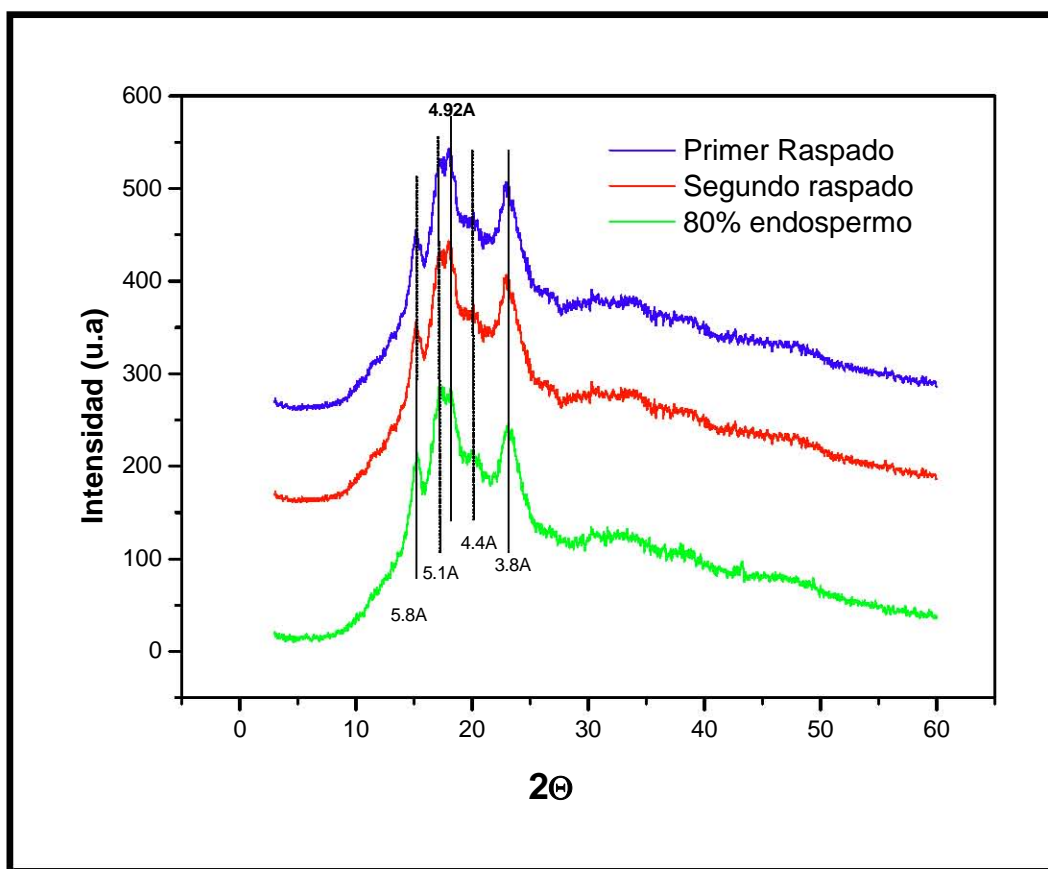


Figura 5.26 Difractograma del endospermo nativo, sin tratamiento térmico-alcálico: primer raspado (10%), segundo raspado (10%) y el 80% restante (control).

5.3.3 Efecto del tratamiento térmico en la estructura cristalina del endospermo

La figura 5.27 muestra los patrones de difracción de rayos X de endospermo nativo tratado térmicamente a 92° C. Se ha, desplazado los difractogramas para identificar los cambios en la figura, Como puede apreciarse, el tratamiento térmico produce cambios de cristalinidad en las capas más externas del endospermo (20%); los patrones de difracción para las capas externas muestran que el almidón de maíz esta totalmente amorfo; es decir la amilosa y la amilopectina que forman los gránulos están perdiendo orden molecular que se refleja en una estructura amorfa.

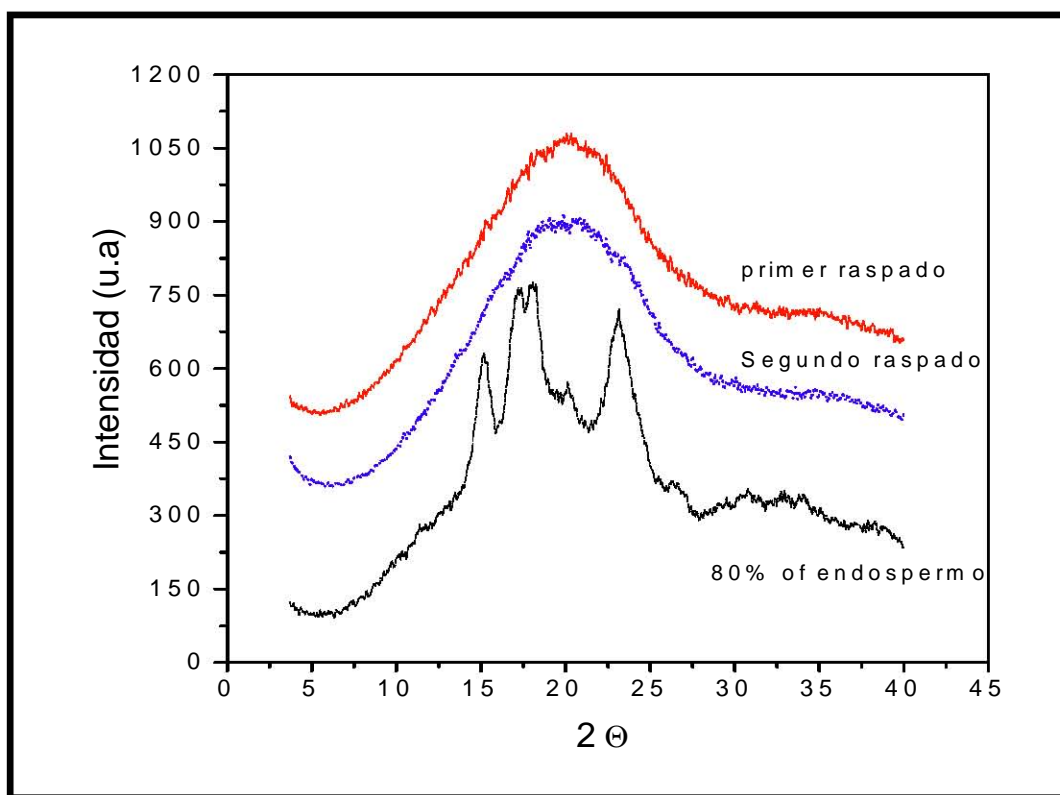


Figura 5.27 Diffractograma del endospermo con tratamiento térmico: primer raspado (10%), segundo raspado (10%) y el 80% restante.

5.3.4 Efecto del tratamiento térmico alcalino en la estructura cristalina del endospermo

El endospermo estudiado tuvo cambios de cristalinidad del endospermo nativo al endospermo con tratamiento térmico, pero no tuvo cambios significativos con relación al

tratamiento térmico y el térmico-alkalino en función del tiempo de reposo, como se muestra en la figura 5.28 para 1 hora de reposo. Se encuentran ligeros cambios en el tamaño y forma de los picos.

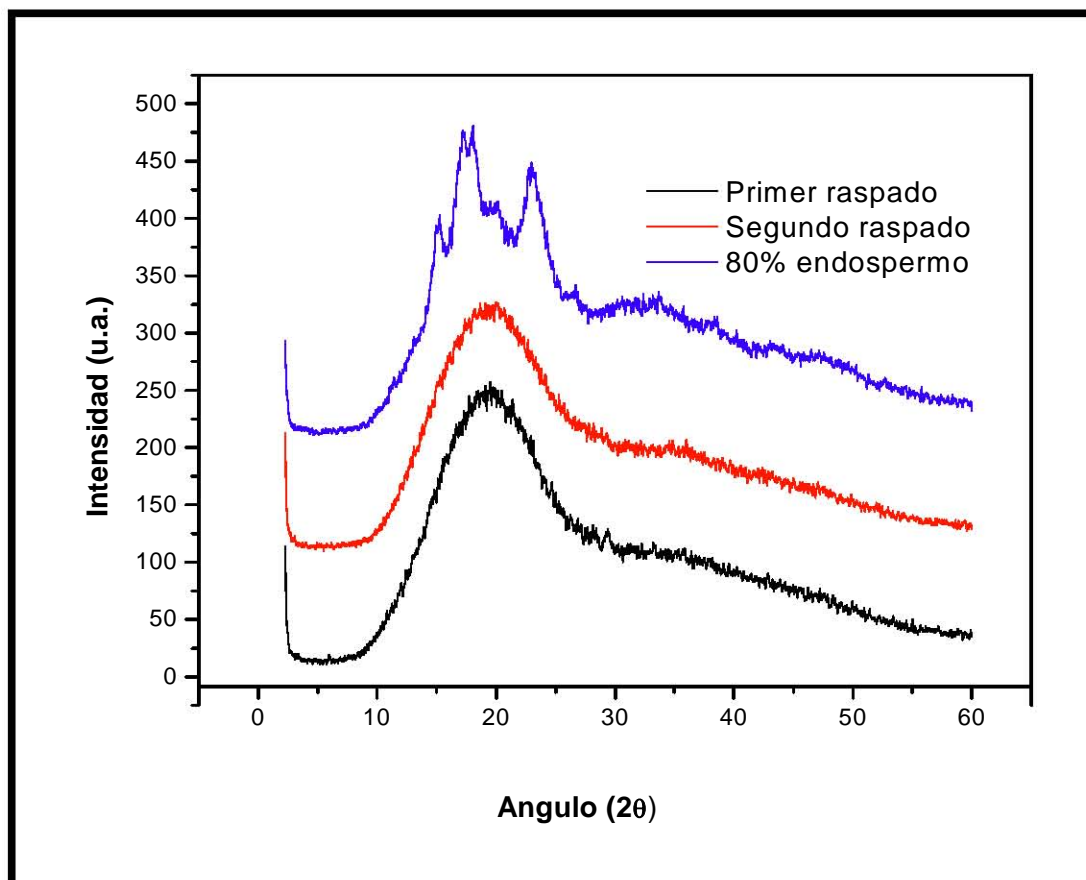


Figura 5.28 Difractograma del endospermo con tratamiento térmico-alkalino 1 h de reposo: primer raspado (10%), segundo raspado (10%) y el 80% restante.

En la Figura 5.29 los patrones de difracción del primer raspado muestra un solo pico a 3.02 \AA que representa al carbonato de calcio (CaCO_3); en las primeras horas de reposo en el nejayote (0, 1 y 3 horas), se nota su presencia pero después se pierde incrementándose ligeramente de las 7 horas en adelante. Es importante señalar que los compuestos de carbonato de calcio son la única forma cristalina en que se encuentra el calcio en el grano de maíz nixtamalizado.

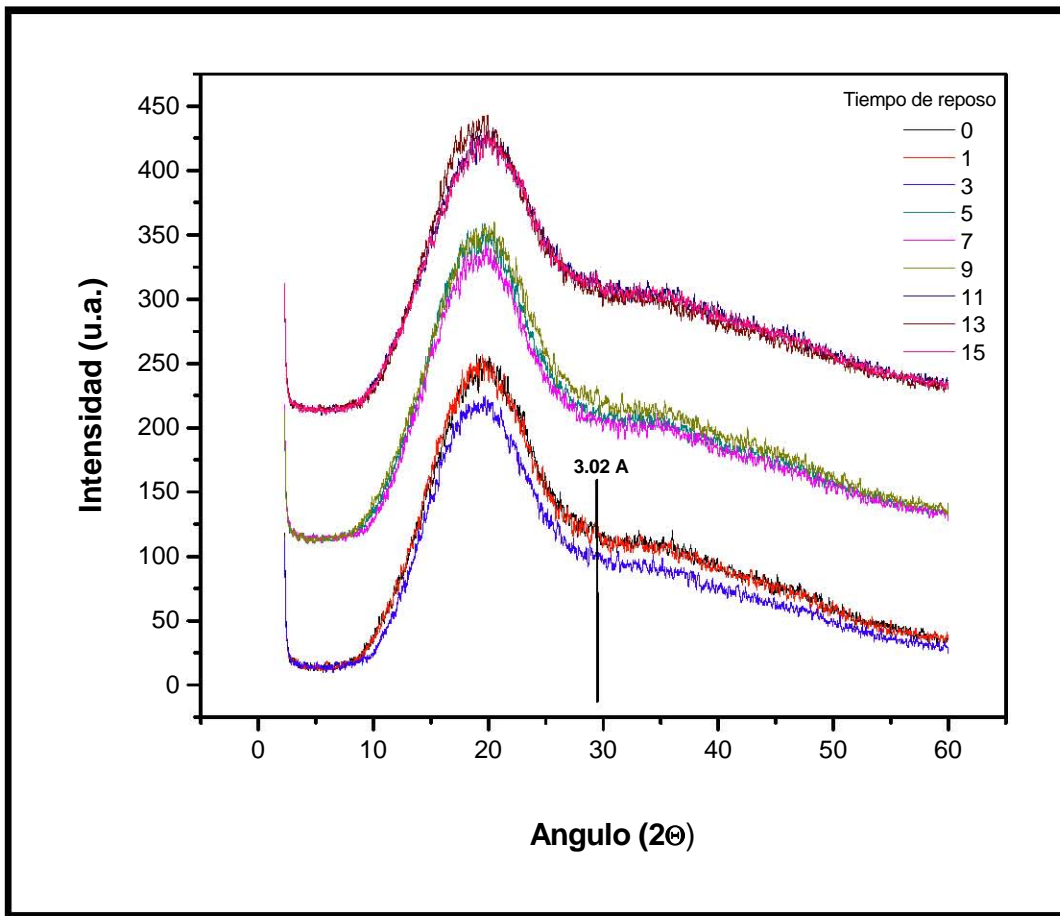


Figura 5.29 Difractograma del endospermo con tratamiento térmico-alcalino de la capa más externa

A medida que transcurre el tiempo de reposo en las otras capas más internas del endospermo, el pico característico correspondiente a la calcita (carbonato de calcio), no se encuentra (figura 5.30). Esto indica que a las 5 horas de reposo se ha perdido parte de la capa de aleurona y el calcio en forma iónica está entrando al interior del endospermo. De acuerdo con Hurtado y col. (2005) el calcio disminuye en el grano por la pérdida del pericarpio y en las partes más externas del endospermo donde se ha fijado, debido al proceso de lavado del grano.

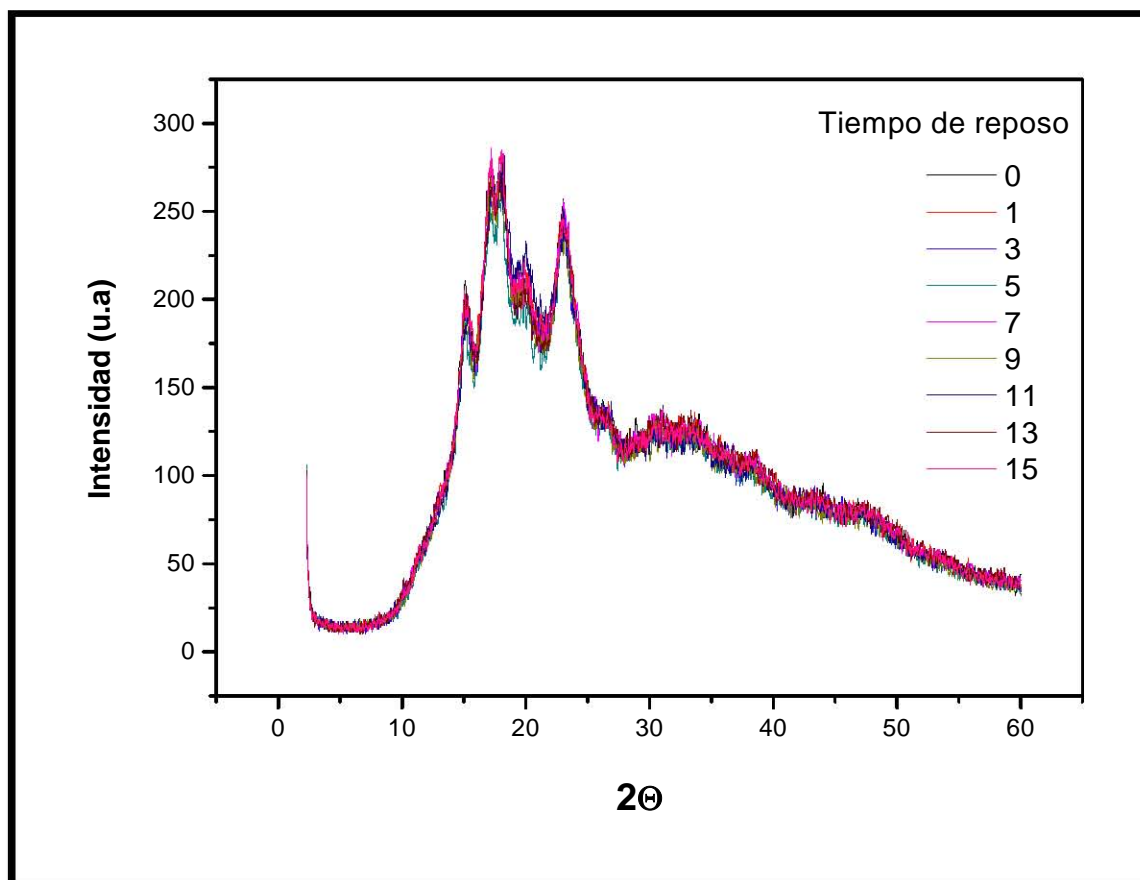


Figura 5.30 Difractograma del endospermo con tratamiento térmico-alkalino de la capa más interna.

En la figura 5.31, se muestra la evolución de la calidad cristalina de las harinas de maíz en función del tiempo de reposo. Como puede apreciarse la calidad cristalina relativa representa los cambios en las redes cristalinas del sistema. La calidad cristalina de harinas con 3 y 5 horas de reposo (región 1) presenta valores más altos por lo que podemos considerar que las mejores harinas se obtienen con tiempos de reposo entre 3 y 5 horas. En la región 2 disminuye la calidad cristalina pero a largos tiempos de reposo (región 3) comienza a mejorar la calidad cristalina.

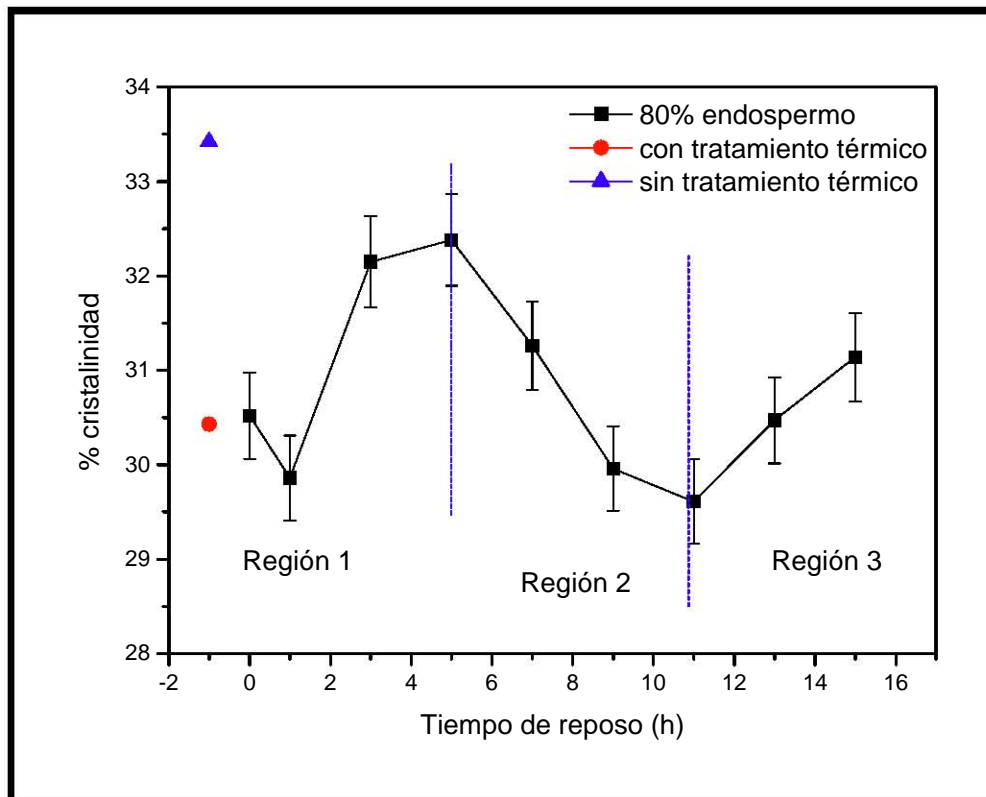


Figura 5.31 **Cristalinidad del endospermo en el 80% en función del tiempo de reposo.**

El incremento en la calidad cristalina del 80% del endospermo nixtamalizado, podría estar relacionado con la entrada de calcio a las partes más internas del endospermo y que de acuerdo a Rodríguez et al (1996), podría ser considerado como un efecto de entrecruzamiento molecular que involucra al calcio con las unidades monoméricas de la amilosa y la amilopectina. A tiempos mayores de 5 horas, la pérdida en la calidad cristalina pudiera estar asociada a que algunos gránulos de almidón de las partes internas estén siendo gelatinizados de manera parcial, lo que contribuye a la disminución del orden molecular dentro de los granos de almidón y una pérdida de calidad cristalina relativa. Para tiempos largos de reposo, continua la entrada de calcio al grano y éste se encuentra en el licor de cocimiento todavía a temperaturas mayores a 40° C, por lo que es factible que se tenga una retrogradación y como se vio en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, se tiene liberación de amilosa que podría contribuir a formar una red que incremente la calidad cristalina del sistema.

Los resultados de este estudio son resumidos en la tabla 5.3 donde el espaciamento inter-planar “d” fue comparado con el reporte de Imberty y col. (1988). En la figura 5.32 se muestra la intensidad relativa de algunos picos característicos de la amilosa en función del tiempo de reposo en el endospermo nixtamalizado. Para cada uno de los picos cristalinos se indica el espaciamento inter-planar “d” correspondiente en 5.8, 5.1, 4.9, 4.4 y 3.8 Å respectivamente. Después del cocimiento hay un ligero incremento en la intensidad de los picos, pero a las 3 horas de reposo disminuye la intensidad de todos los picos, indicando que la estructura cristalina del almidón fue parcialmente destruida; a las 5 horas de reposo vuelve a incrementarse, debido quizá a un proceso de recristalización o de entrecruzamiento molecular (Gómez y col., 1989).

Tabla 5.3. Datos de difracción para el endospermo del híbrido H368-C.

$2\theta(^{\circ})$	$d(\text{Å})$	hkl
5.8	15.16	020
5.1	17.22	103
4.9	18.01	121
4.4	19.98	004
3.8	23.04	123

Gómez y col. (1992) reportó que el cocimiento reduce la intensidad de los mayores picos, indicando que la estructura cristalina del almidón fue parcialmente destruida y después del reposo se ha recuperado esta estructura por anillado (annealing, en inglés). Considerando la preparación de las muestras no se puede hacer una correlación debido a que el análisis se realizó en el todo el grano. Por otra parte, Rodríguez y col. (2001) realizaron medidas al endospermo total nixtamalizado reportando que tiene un patrón cristalino al endospermo crudo.

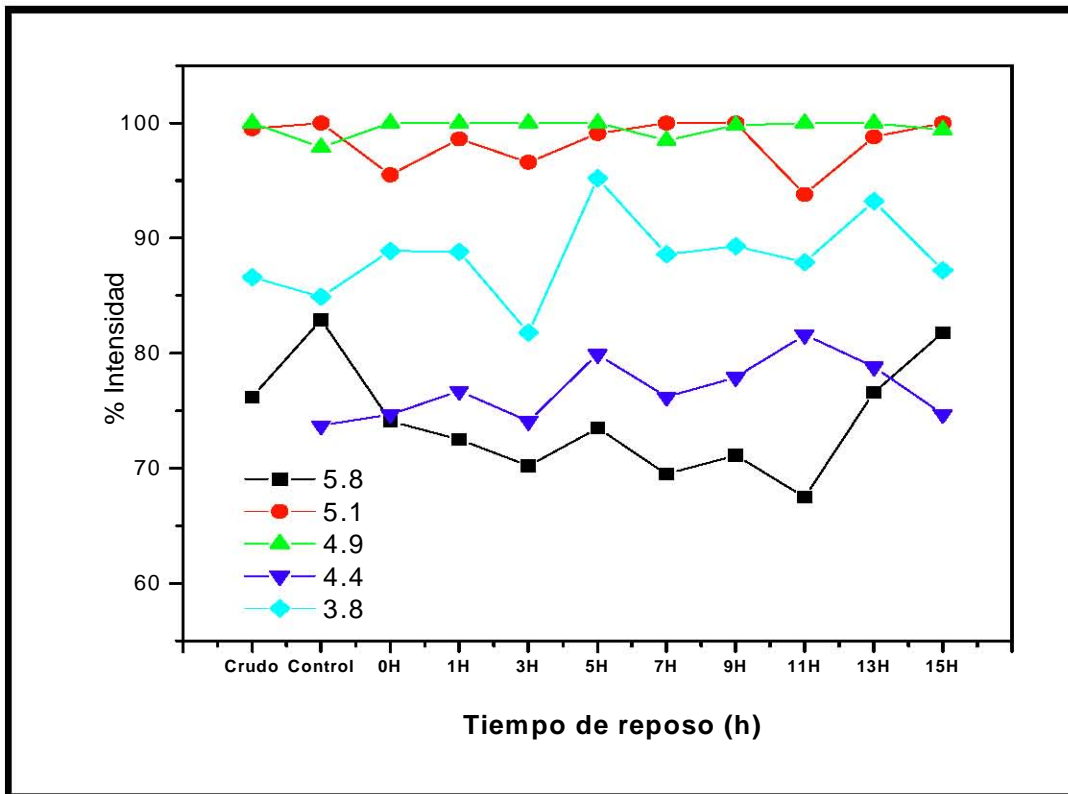


Figura 5.32 Porcentaje de la Intensidad de difractogramas de rayos X en el 80% del endodermo nixtamalizado a 92° C.

5.4 Calorimetría diferencial de barrido en el endospermo.

Mediante el uso de calorimetría diferencial de barrido (DSC), también es posible estudiar las transformaciones en el almidón debidas a la interacción del gránulo con calor y agua. Como se mencionó inicialmente, se realizó el cocimiento sin hidróxido de calcio (o muestra control) y se estudió la evolución de la gelatinización en las diferentes capas del endospermo, estratificado en el 10%, subsiguiente 10% y el restante 80%.

La figura 5.33 muestra el comportamiento del flujo de calor en función de la temperatura para el 10% más externo del grano control. Como se puede observar el solo tratamiento térmico produce gelatinización en las capas más externas del endospermo, no hay un pico endotérmico típico de la gelatinización del almidón (68-70° C). Este resultado concuerda con el resultado para las transformaciones estructurales de esta misma región del endospermo mostrado en el espectro de difracción de rayos X de la figura 5.27. De acuerdo a los análisis de rayos X y de calorimetría diferencial es evidente que la gelatinización de la parte más externa del endospermo se produce debido al tratamiento térmico.

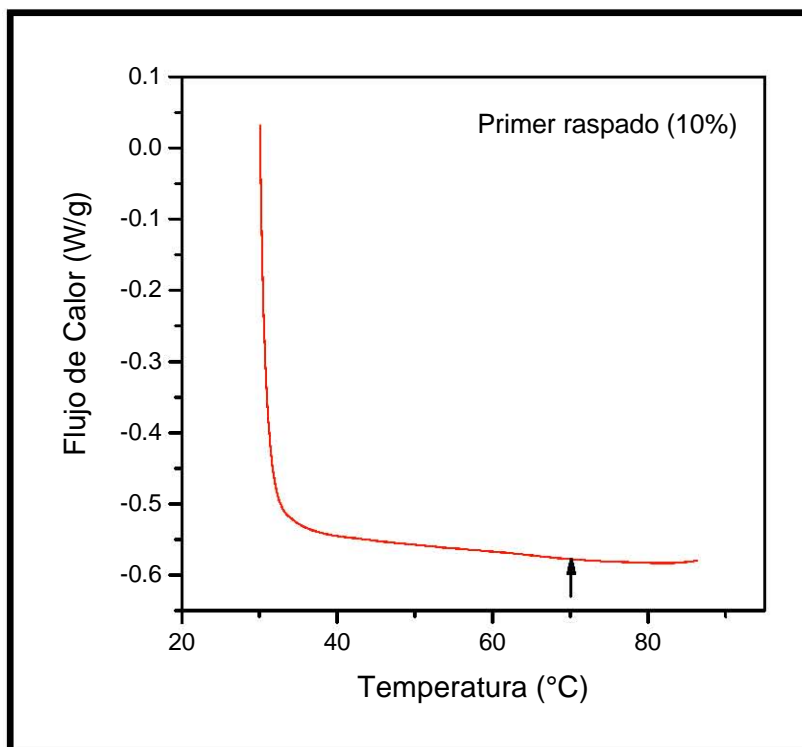


Figura 5.33. Termograma de la parte más externa del endospermo, con tratamiento térmico.

En la subsiguiente capa del 10% (segundo raspado) se encontró el mismo comportamiento que en la capa más externa del endospermo (el termograma no se muestra aquí), mientras que para el 80% restante muestra una temperatura de gelatinización a 72.01°C , como se muestra en la figura 5.34.

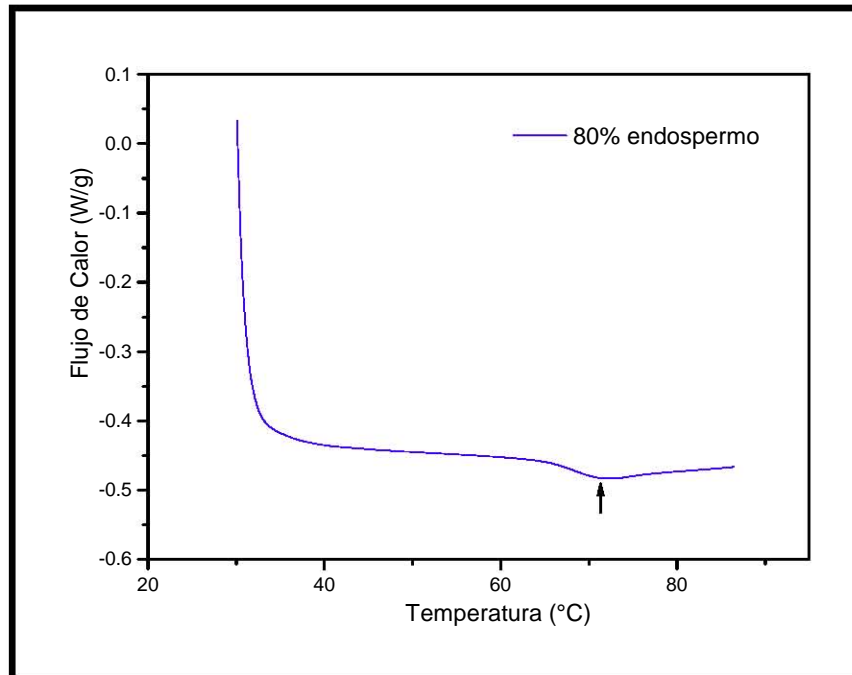


Figura 5.34. Termograma del endospermo obtenido por DSC.

Como se puede apreciar el sólo tratamiento térmico produce gelatinización en las zonas exteriores (20% del grano), por que se tiene los dos factores importantes como los son el agua y el calor. En la siguiente sección se mostrara el análisis en las muestras nixtamalizadas.

La figura 5.35 muestra los termogramas del endospermo, para 1 hora de reposo, para la capa más externa (10%), el siguiente 10% y el 80% restante de las obtenidas por calorimetría diferencial de barrido, para granos nixtamalizados a 92°C . Como puede apreciarse, las capas más externas presentan el fenómeno de gelatinización total, debido al proceso de nixtamalización, al no exhibir el pico endotérmico característico del almidón. Mientras que en el 80% del endospermo aparece el pico endotérmico característico del proceso de gelatinización en el almidón de maíz (formado de 64 a 81°C) [Arambula y col.,

2001]. Alrededor de este rango de temperatura el agua actúa como un plastificante. A esta temperatura, los polímeros con bajo peso molecular, particularmente las moléculas de amilosa, empiezan a separarse del gránulo del almidón. Conforme la temperatura aumenta, los gránulos del almidón comienzan a colapsar hasta que finalmente la parte amorfa (amilosa) queda totalmente solubilizada, mientras que la parte cristalina del almidón se mantiene en la solución acuosa.

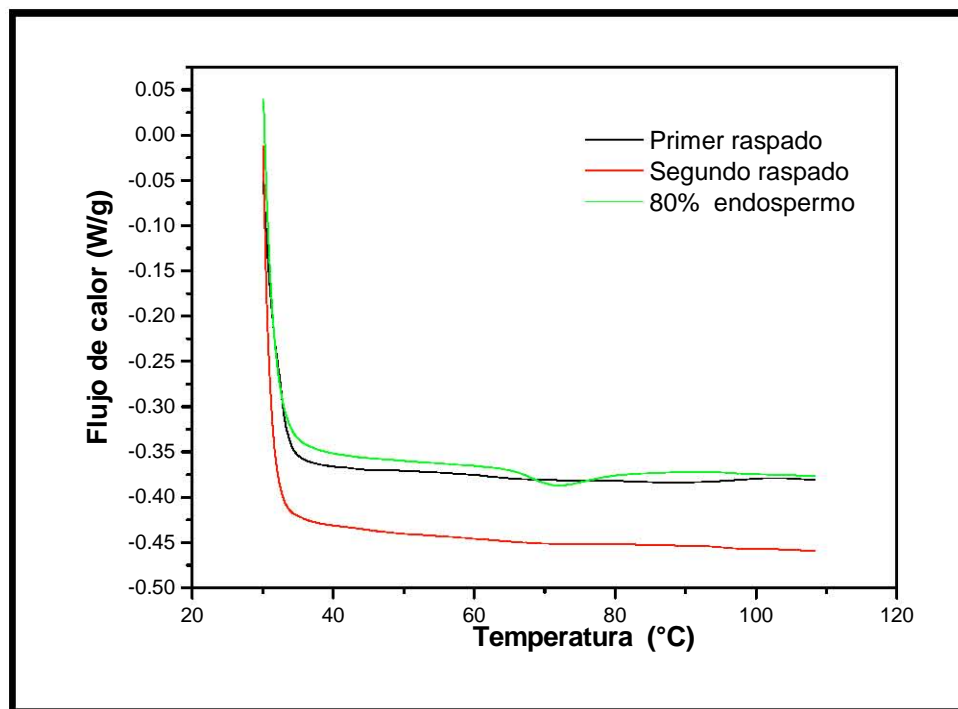


Figura 5.35 Termograma del endospermo nixtamalizado obtenido por DSC a 1h de reposo.

En la figura 5.36 se muestra el análisis de calorimetría diferencial de barrido para la capa más externa del endospermo nixtamalizado en función del tiempo de reposo, donde se observa que las muestras ya presentaban el fenómeno de gelatinización. En el 80% restante, figura 5.37, el gránulo de almidón se encontraba parcialmente gelatinizado y no hay diferencias significativas en la temperatura de gelatinización para los diferentes tiempos de reposo en todas las curvas se observa el pico endotérmico cercano a 72% típico de la gelatinización del almidón. En conclusión, los resultados obtenidos en Calorimetría diferencial de barrido están en acuerdo a los obtenidos en rayos X; siendo esta última

técnica más factible para el estudio de los cambios estructurales en el endospermo del grano de maíz.

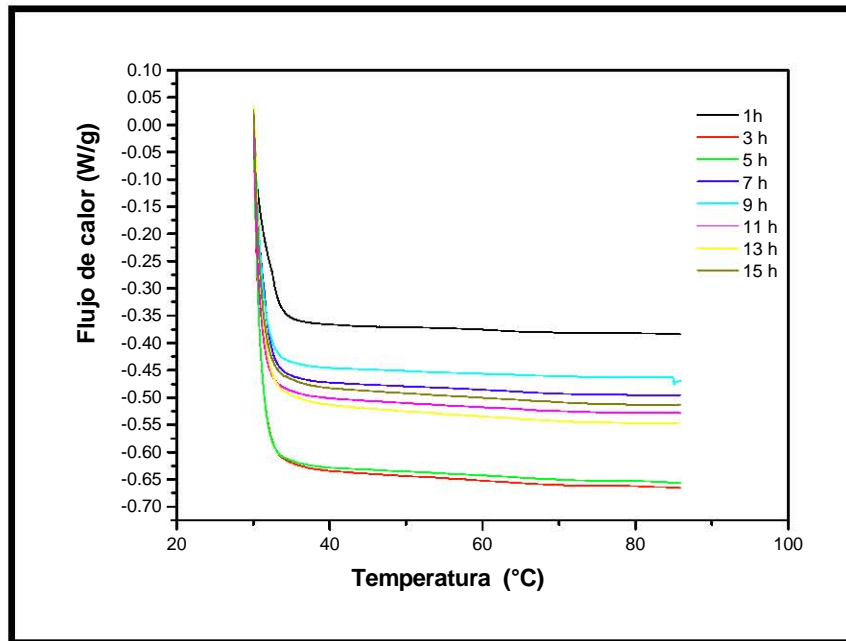


Figura 5.36 Termograma de la capa más externa del endospermo nixtamalizado en función del tiempo de reposo

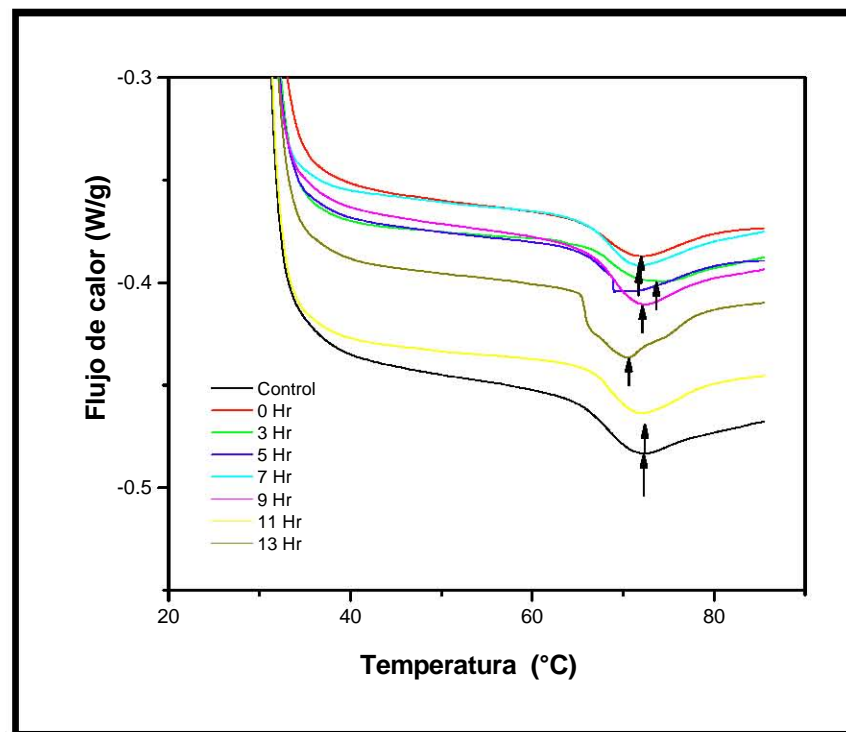


Figura 5.37 Termograma del 80% del endospermo nixtamalizado en función de su tiempo de reposo.

El análisis del pico endotérmico de la temperatura de gelatinización para el 80% del endospermo parcialmente gelatinizado es mostrado en la figura 5.38. De acuerdo a esta figura el 80% del endospermo presenta niveles muy bajos de gelatinización. Si comparamos la figura 5.31 de la calidad cristalina relativa para el 80% del endospermo podemos observar que el análisis de difracción de rayos X es más sensitivo a los cambios que ocurren en esta región del endospermo y a diferencia del análisis de calorimetría diferencial de barrido, el análisis de cristalinidad no requiere de preparación de la muestra ni del estudio de un sistema mixto como el agua y el almidón.

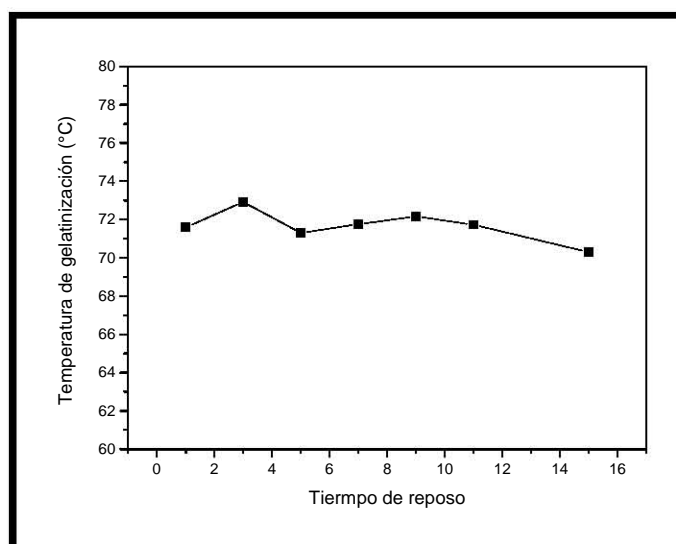


Figura 5.38. Temperatura de gelatinización del 80% del endospermo en función de su tiempo de reposo.

El proceso térmico alcalino indujo cambios micro-estructurales en el endospermo, los cambios mayores se observó en el 20% de la parte más externa de esta estructura. Estos resultados no pueden ser comparados con la literatura debido a que en la actualidad no se han realizado investigaciones encauzadas a esta estructura.

Los gránulos de almidón al interactuar con agua y temperatura presentan cambios en la forma y tamaño (figura 5.39 y 5.40). Evidentemente, el calcio juega un papel importante en el pericarpio y la capa de aleurona. Observando los mayores cambios en los gránulos de almidón y matriz proteica en el endospermo periférico. En la figura 5.39 muestra en su superficie del gránulo de almidón un hojuelo y ha incrementado su tamaño (figura 5.39-b),

mientras que en la figura 5.39-c se ha colapsado disminuyendo su tamaño. Con la figura 5.39-d se observó que el gránulo ha perdido su organización completamente.

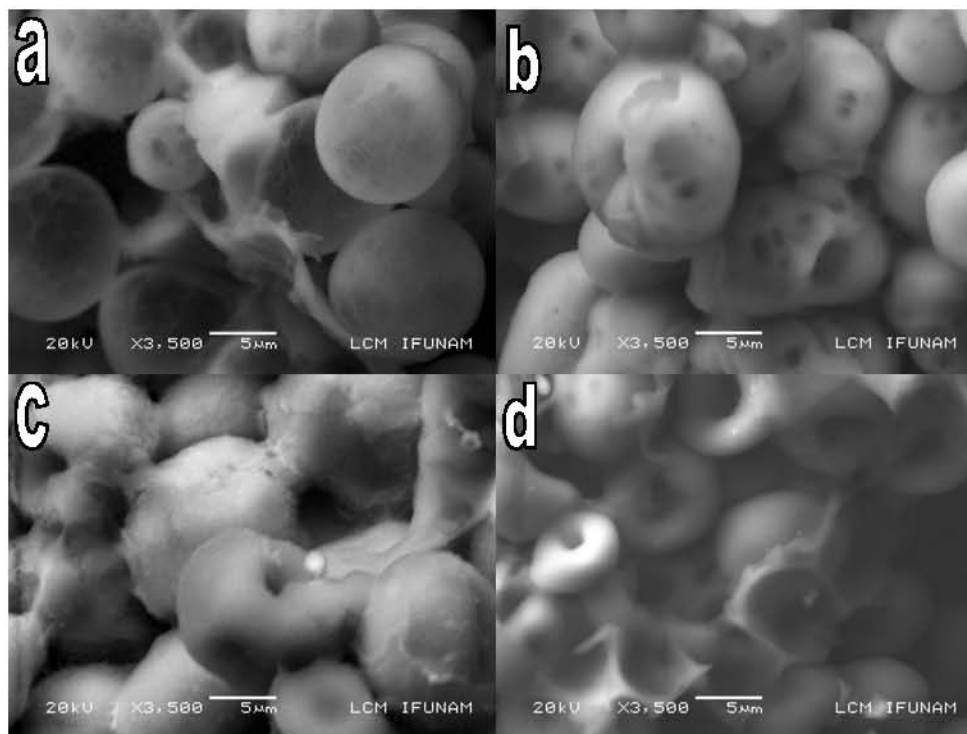


Figura 5.39. Micrografía de los gránulos de almidón en el endospermo periférico.

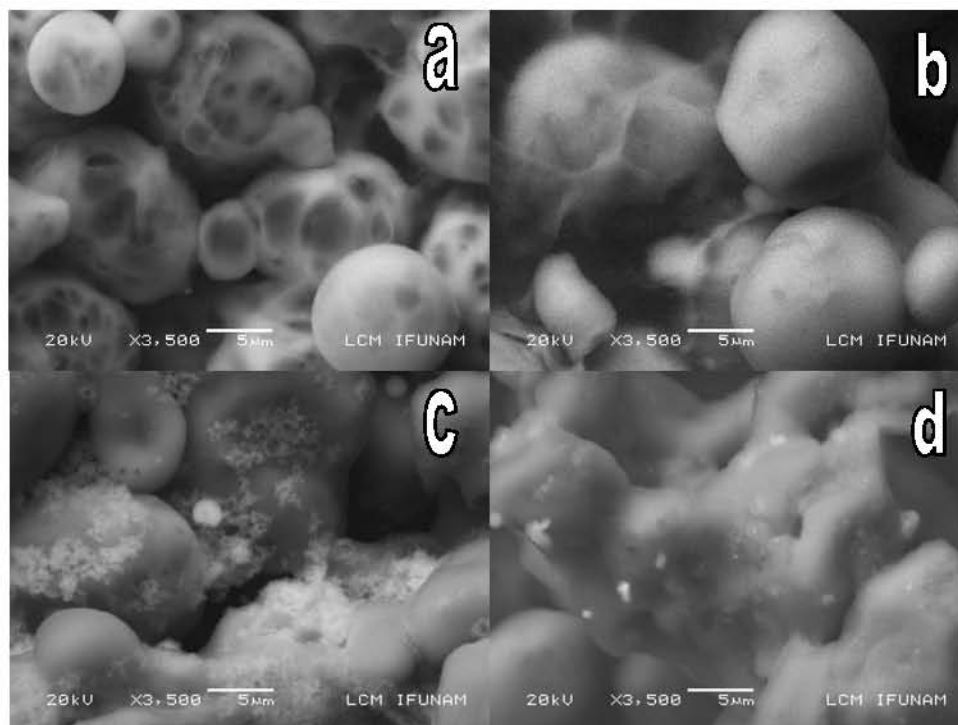


Figura 5.40. Micrografía de los gránulos de almidón en el endospermo harinoso.

En la figura 5.40 se muestra como los gránulos de almidón en el endospermo harinoso no muestran el hojuelo, pero si muestran un hinchamiento hasta llegar a una pérdida de su forma y tamaño. En la figura 5.40-c y d, se observa los gránulos de calcio. En la figura 5.41 muestra el comportamiento de los gránulos en donde se observó una tendencia similar en el endospermo harinoso como en el periférico, a las 15 horas hay una disminución significativa de los gránulos de almidón debido a la parcial y total gelatinización.

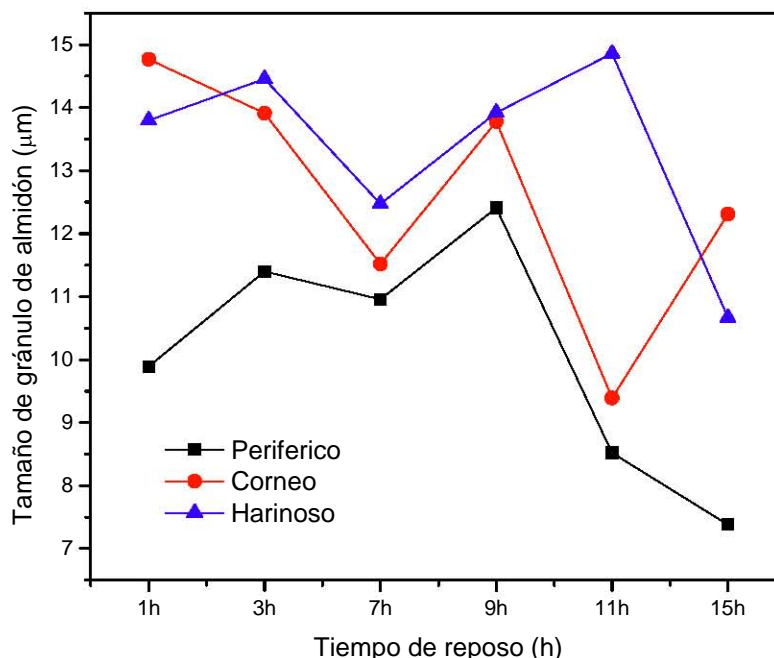


Figura 5.41. **Tamaño promedio de los gránulos de almidón del endospermo en función de su tiempo de reposo.**

Gómez y col. (1992) reportaron, que el gránulo de almidón sufre un limitado hinchamiento debido una restricción en las células del endospermo y el insuficiente calor y humedad durante el cocimiento y reposo. Trejo-González y col. (1982) reportó que el hidróxido de calcio fue absorbido o se une a los gránulos de almidón durante el cocimiento alcalino y reposo. De acuerdo a Robles (1988), la gelatinización de almidón durante la nixtamalización es inhibido por interacción amilosa-calcio. La reacción de iones de calcio a la superficie de los gránulos de almidón causa el hinchamiento e inhiben el suministro de agua al interior de este demorando la gelatinización (Goush y Pybus, 1973). Cuando el

contenido de calcio aumenta en función del tiempo de reposo en el endospermo, la cristalinidad decrece (figura 5.42).

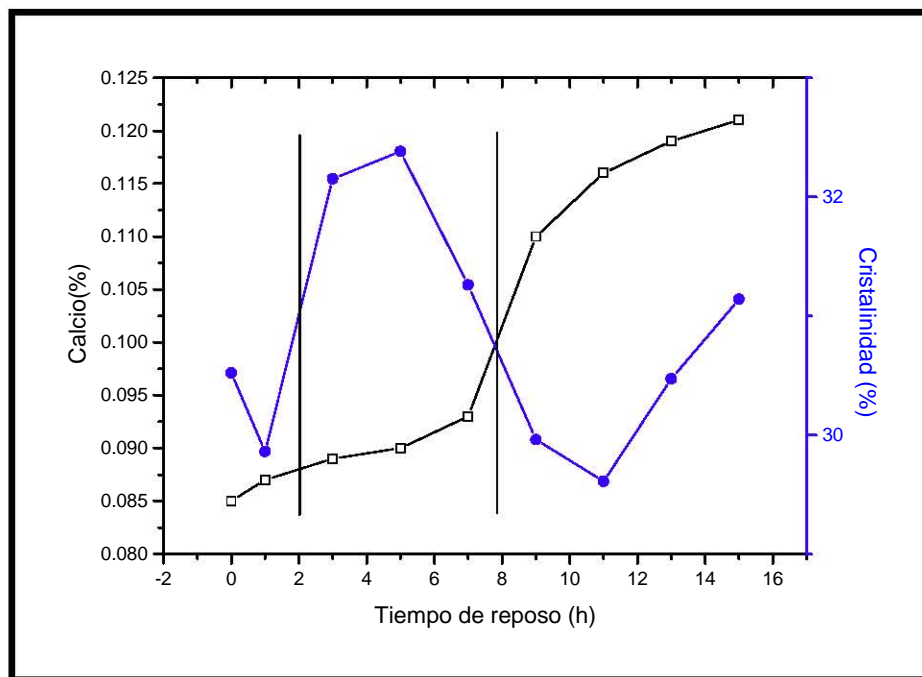


Figura 5.42 Contenido de calcio (●) y cristalinidad (□) del endospermo en el 80% en función del tiempo de reposo.

De estos resultados se concluye que el tratamiento de calor/humedad son los responsables de los cambios estructurales en el endospermo (como se documenta por difracción de rayos X) y forma un hoyuelo en el centro de cada gránulo de almidón. La nixtamalización causa lo antes mencionado y es prácticamente una evolución de la calidad cristalina e incorporación de calcio durante el tiempo de reposo, como se observó en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Finalmente, se puede definir el proceso de nixtamalización como: proceso térmico alcalino a que es sometido el grano de maíz y produce transformaciones estructurales en el almidón provocando la amorfización total de las partes más externas del endospermo y pequeñas modificaciones estructurales en las partes más internas. Esta definición está en desacuerdo con los reportes científicos existentes hasta el momento, en los que se manifiesta que el proceso de nixtamalización produce cambios parciales en el almidón (Gómez et al 1989, 1992; Paredes-López et al, 1983; entre otros).

VI. CONCLUSIÓN

Durante el proceso térmico alcalino observamos cambios estructurales en función del tiempo de reposo, cada hora que transcurre induce cambios estructurales en el grano de maíz, produciendo cualidades aceptables o no en los productos nixtamalizados.

El pericarpio es la estructura anatómica que tiene el primer contacto con el licor de cocimiento, delimitando la difusión de agua y calcio al interior del grano y por consiguiente puede afectar los cambios fisicoquímicos en el interior del mismo.

De acuerdo con las imágenes de microscopía electrónica de barrido, la matriz proteica juega un papel importante en el control del hinchamiento de los gránulos de almidón y por consiguiente en los cambios físicoquímicos del almidón durante el proceso de nixtamalización.

La formación de pozos o túneles facilitando la entrada de agua y calcio al endospermo periférico y corneo durante las primeras horas de reposo. Así observamos cambios significativos en el endospermo no homogéneos, encontrando gránulos parcialmente gelatinizados en el endospermo córneo, hinchados en el harinoso y en el periférico cambios en su superficie. El hinchamiento en los gránulos de almidón en el endospermo harinoso a 1 hora del 70% posiblemente se deba a que también hay difusión agua y calcio a través de la cofia.

De acuerdo con estudios de difracción de rayos x realizados de manera estratificada en el endospermo, se puede inferir que el 20% más externo de esta estructura está gelatinizado como producto del tratamiento térmico alcalino y que el solo tratamiento térmico también provoca cambios estructurales en las capas más externas. Este resultado fue confirmado para todos los tiempos de reposo mediante el uso de calorimetría diferencial de barrido, donde no se obtuvo un pico endotérmico, lo que significa que estas regiones ya habían sido gelatinizadas como resultado del tratamiento térmico o térmico alcalino.

De acuerdo con los estudio de difracción de rayos x, en las estructuras más internas del endospermo del grano nixtamalizado no se presenta gelatinización total. Esto puede ser debido a que en el interior del grano no ha ocurrido una difusión de agua suficiente que permita el proceso de gelatinización. Estos resultados fueron confirmados con el estudio mediante calorimetría diferencial de barrido para esta parte del endospermo, donde se encontró la existencia del pico endotérmico de la gelatinización del almidón entre 68 °C y 72°C.

Mediante la técnica de rayos X, observamos los cambios físicos que se producen en la amilosa en función de su tiempo de reposo durante el tratamiento térmico alcalino, los cuales se deben a las modificaciones estructurales que sufre el gránulo de almidón. Así la difracción de rayos X es más sensitiva que el análisis de calorimetría diferencial de barrido. Además de ser una técnica no destructiva y la muestra no necesita preparación.

La nixtamalización es la gelatinización total de los gránulos de almidón de las capas más externas del endospermo y una parcial gelatinización de la capa más interna.

Los resultados de esta investigación pueden facilitar la identificación de una hora crítica responsable de la modificación de cambios estructurales y ser aplicado en la industria de harina de maíz nixtamalizada, donde puede tener impacto nutricional al utilizar esta variedad de maíz. Así como encontrar procesos alternos al tradicional.

REFERENCIAS

- Agama-Acevedo E., Ottenhof M. A., Farhat I., Paredes-López O., Ortíz-Cereceres J. y Bello-Pérez A. 2004. Efecto de la nixtamalización sobre las características moleculares del almidón de variedades pigmentadas de maíz. *Interciencia*. 29(11): 643-649.
- Almeida-Dominguez, H. D., Suhendro, E. L., and Rooney, L. W. 1997. Corn alkaline cooking properties related to grain characteristics and viscosity (RVA). *J. Food Sci.* 62:516-523.
- Arámbula-Villa G., Barrón-Ávila L., González-Hernández J., Moreno Martínez E., Luna-Bárceñas G., 2001. Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Arch. Lat. Nut.*, Vol. 51(2), 187-194.
- 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(3): 306-311.
- Bjarnason, M. and Palmer, W. G. 1972. The maize germ: its role as a contributing factor to protein quality and quality. *Z. Pflanzenzücht* 68:83-89.
- Bello-Pérez, L. A. y O. Paredes-López. 1999. El almidón: lo comemos, pero no lo conocemos. *Ciencia*. 50(3): 29-33.
- Bello, P.L.A., Osorio, D.P., Amaga, A. E., Núñez, S.C., and Paredes- López, O. 2002. Chemical, physicochemical and rheological properties of masa and nixtamalized corn flour. *Agrociencia* 36:319.
- Billeb de Sinibaldi A. C. y Bressani R. 2001. Características de cocción por nixtamalización de once variedades de maíz. *Arch. Lat. Ame. Nutr.* 51(1) 86-94.
- Braham, J.E. and Bressani, R. 1966. Utilización del calcio del maíz tratado con cal. *Nut. Bromatol. Toxicol.* 5:14-19.
- Bressani, R., Benavides, V., Acevedo, E., & Ortiz, M. A. 1990. Changes in selected nutrient content and in protein quality of common and quality protein maize during tortilla preparation. *Cereal Chem.* 67 (6): 515–518.
- Bressani, R., Turcios, J.C., Reyes, L. y Mérida, R. 2001. Caracterización física y química de harinas industriales nixtamalizadas de maíz de consumo humano en América Central. *Arch. Lat. Amer. Nutr.* 51:309-313.
- Bryant, C.M., and Hamaker, B.R. 1997. Effect of lime on gelatinization of corn flours and starch. *Cereal Chem.* 74(2): 171-175.

- Cameron, R. and Donald, A. M. 1993. A small-angle X-ray scattering study of starch gelatinization in excess and limiting water. *Journal of polymer science: part B: polymer physics*. 31, 1197-1203.
- Campas-Baypoli, O. N., Rosas-Burgos, E. C., Torres-Chávez, P. I., Ramírez-Wong B., Serna-Saldívar, S. O. 2002. Physicochemical changes of starch in maize tortillas during storage at room and refrigeration temperatures. *Starch*. 54 (8): 358-363.
- Casanueva, E., Kaufer-Horwite M., Lizaur Pérez A. B. and Arroyo P. 2001. 2a edición, *Nutriología Médica*. Médica Panamericana. México, D. F.
- Chang, Y.H. and Hsu, K.H. 1985. Extent of starch gelatinization during hydrothermal processing of corn in masa production (Abstract). *Cereal Foods World* 30:545.
- Dengate, H. N. 1984. Swelling, pasting, and gelling of wheat starch. Pages 49-82 in: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. VI. Y. Pomeranz, ed. Am. Assoc. Cereal Chem.: St. Paul, MN.
- Díaz, C., H. y R.I. Rochin R. 1993. Contribuciones de México a la alimentación y a la agricultura mundiales, pp. 101-140. En: J. de la Fuente, R. Ortega y M. Sámano (coords.). *Agricultura y agronomía en México*. 500 años. Universidad Autónoma Chapingo.
- Donovan, J.W., Lorenz, K., and Kulp, K. 1983. Differential scanning calorimetry of heat-moisture treated wheat and potato starches. *Cereal Chem*. 60: 381-387.
- Fernández-Muñoz, J.L., Rojas-Molina, 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.
- Galliard, T. 1987. *In starch: properties and potential*. Chichester, U.K.: John Wiley and Sons.
- Gómez, M.H., Mc Donough, M.C., 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. Corn starch Characterization of nixtamalized Corn Flour *Cereal Chem*. 68: 578-582.
- Gómez, M.H., Lee J. K. Mc Donough 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.
- González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figueroa, J. M. & Sánchez-Sinencio, F. (2004) Physicochemical changes in the hull of corn grains during their alkaline cooking. *Food Chem.*, 52:,3831-3837.

- Hart, F.L. y Fisher, H.J. 1991. Análisis moderno de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.
- Imberty, A, Chanzy H, Pérez S, Buleon A, Tran V (1988) The double-helical nature of the crystalline part of A-starch. *J. Molec. Biol.* 201: 365-378.
- Illescas, R. 1943. La teoría química de la formación del nixtamal. *Rev. Sociedad Mexicana de la Historia Natural.* 4: 129-148.
- Inglett, G. E. 1970. Kernel structure, composition, and quality. Cap. 7. En: "Corn: culture, processing products. Major feed and food crops in agriculture and food series". Inglett G. E. (Ed). The AVI publishing, Co. Inc. Westport CT, EUA.
- Jacobs y Delcour. Hydrothermal Modification of Granular Starch with Detention of the Granular Structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* Vol. 46.1998.
- Katz, S. H., M. L. Hediger, L.A. Valleroy. 1974. Traditional Maize processing Techniques in the New World. *Science* 184:765-773
- Kawabata, A., Takase, N., Miyoshi, E., Shigeru Sawayama S., Kimura T., Saitama and Kudo K. 1994. Microscopic observation and X-ray diffractometry of heat/moisture-treated starch granules. *Starch* 46 (12): 463-469.
- Klaus J. L. and Karel K. 1991. Handbook of Cereal Science and Technology"
- 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.
- Lemus-Flores, B., Calidad nutricional de maíz, tortilla y frijol y nivel de complementación de la mezcla tortilla con frijol, in *Ingeniería Bioquímica.* 2003, Instituto Tecnológico de Celaya, Gto. P. 98.
- Levine, H., Slade, L. Influences of the Glassy and Rubery States on the Thermal Mechanical and Structural Properties of Doughs and Baked Products. *Dough Rheology and Baked Products Texture*, capítulo 5. Ed. H Faradi and J. M. Faubion. AVI Publising Co., New York. 1990.
- Martínez, R., Mendoza, S., Reguera, E., Ortiz, P. and Martínez, J. de la L. 2001. Kinetic approach to nixtamalization of corn pericarp. *Cereal Chem. Inc.*78(2) 107-110.
- Méndez-Montevalvo, G., 2005. Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México. *Agrociencia.* 39: 267-274.
- Mertz, E.T., Bates, L.S. and Nelson, O.E. 1964 Mutant gene that changes protein composition and increases lisyne content of maize endosperm. *Sci.* 145: 279-280.

- Mondragón M., Bello-Pérez L. A., Agama E. Melo A., Betancur-Ancona D. and Peña J. L. Effect of nixtamalization on the modification of the crystalline structure of maize starch. *Carbohydr. Polym.* 55: 411–418.
- Mora-Escobedo R., Osorio-Díaz P., Garcia-Rosas M. I., Bello-Perez A. and Hernandez-Unzon. 2004. Changes in selected nutrients and microstructure of white starch quality maize and common maize during tortilla preparation and storage. *Food Sci. Tech. Int.* 10(2):79-87.
- Morrison, W. R. , Tester, R. F., Snape, C. E., Law, R., y Gidley, M. J. 1993. Swelling and gelatinization of cereal starches. IV. Some effects of lipid-complexed amylose and free amylose in waxy and normal barley starches. *Cereal Chem.* 70:385-391.
- Paredes- López, O., and Sarharopulos- Paredes, M.E. 1982. Scanning electrón microscopy of limed corn kernels for tortilla marking *J.Food Technol.* 17: 687.
- Robles, R.R., Murray, E. D., and Paredes-Lopez, O. 1988. Physicochemical changes of maize starch during the lime-cooking treatment for tortilla making. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23:1-98.
- Rodríguez, P., San Martín, M.E. y González de la Cruz, G. 2001. Calorimetría diferencial de barrido y rayos-x del almidón obtenido por nixtamalización fraccionada. *Superficies y Vacío.* 13: 61-65.
- Rodríguez, M.E., Yáñez-Limón, J.M., Alvarado, J.J., Vargas, H., Sánchez-Sinencio, F., Figueroa, F., Martínez, B.F., González-Hernández, J., Silva, M.D., and 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: 593-600.
- Rooney, L.W., and Serna-Saldivar, S.O. 1987. Food uses of whole corn and dry-milled fractions. pp. 399-429. In: *Corn Chemistry and Technology.* S.A. Watson and P.E. Ramstad, eds. Amer. Assoc. Cereal Chem. St. Paul, MN.
- Sajilata, M. G. , Singhal, Rekha S. and Kulkarni Pushpa R. 2006. Resistant starch- A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 5:1-17.
- Sandoval A., Rodriguez E. y Fernandez A. 2005. Aplicación del análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la caracterización de las modificaciones del almidón. *Dyna.* 72(142): 45-53.
- Sefa-Dedeh, S., Cornelius, B., Sakyi-Dawson, E., Afoakwa, E. 2004. Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize. *Food Chem.* 86: 317–324.
- Serna-Saldivar, S. O., Gomez, M. H., and Rooney, L. W. 1990. Technology chemistry and nutritive value of alkaline-cooked corn products. Pages 243–295 in: *Advances in cereal science and technology.* Y. Pomeranz, eds. American Association of Cereal Chemists Inc.: St. Paul, MN.

- Urizar, L., and Bressani, R. 1997. Efecto de la nixtamalización del maíz sobre el contenido de ácido fólico, calcio, hierro total y biodisponible. *Arch. Lat. Amer. Nutr.* 47:217-223.
- Tester R. F., Debon S. J. J. and Sommerville. 2000. Annealing of maize starch. *Carbohydrate Polymers.* 42: 287-299.
- Trejo-González, A., Feria- Morales, A., and 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. Pages 245- 263 in : *Advances in Chemistry.* R.E. Freney and J.R. Whitaker, eds. Acs: Washington, D.C.
- Vázquez C. G. Salinas M. Y. El Mejoramiento de la Calidad de la Tortilla de Maíz. En: Torres F., Moreno E., Chong I. y Quintanilla J. 1996. eds. *La Industria de la Masa y la Tortilla.* México; PUAL, UNAM. 127-138.
- Vázquez, C. M. G., Guzmán B., J. L. Andrés G., F. Márquez S., y J. Castillo M., Calidad de grano y tortillas de maíces criollos y sus retrocruzas. *Rev. Fitotec. Mex.*, 2003. 26(4): p. 231-238.
- Villegas, E. Factors limiting quality protein maize (QPM) development and utilization. in *Quality Protein Maize: 1964-1994.* 1994. Sete Lagoas, MG, Brazil: EMBRAPA/CNPMS.
- Watson, S.A., and Ramstad, P. E. 1987. *Corn Chemistry and Technology.* Cereal Chem. Inc. St Paul, Minnesota, U.S.A.
- Weber, E. J., in: "Corn: Chemistry and Technology" (Eds. S. Watson and Paul E. Ramstad; Amer. Assoc. Cer. Chem., Inc., St. Paul, Minn., USA, 1987), p. 311.
- Wolf, M.J., Buzan, C.L., Mac Masters, M.M., and Rist, C.E. 1952. Structure of the mature corn kernel I. Gross, Anatomy and Structural relationships. *Cereal Chem.* 29(5):321-333.
- Zazueta, C., Ramos, G., Fernández- Muñoz, J.L., Rodríguez, M. E., Acevedo-Hernández, G., and Pless, R.C.2002. A radioisotopic study of the entry of calcium ion into the maize kernels during nixtamalization. *Cereal Chem.*79:500-503.
- Zobel, H. F. 1986. Starch crystal transformation and their industrial importance. *Starch.* Vol. 40.
- Zobel, H.F., Young, S.N., and Rocca, L.A. 1988. Starch gelatinization: An X-ray Diffraction Study. *Cereal Chem.* 65(6): 443-446.

APENDICE

Study of Structural and Thermal Changes in Endosperm of Quality Protein Maize During Traditional Nixtamalization Process

Isela Rojas-Molina,^{1,2} Elsa Gutierrez-Cortez,^{3,4} Alin Palacios-Fonseca,^{1,5} Leticia Baños,⁶ J. L. Pons-Hernandez,⁷ S. H. Guzmán-Maldonado,⁷ P. Pineda-Gomez,⁸ and M. E. Rodríguez^{1,9}

ABSTRACT

Cereal Chem. 84(4):304–312

This work presents the study of the structural changes of the endosperm of Quality Protein Maize (QPM H-368C), modified by alkaline cooking at two different temperatures (72 and 92°C) and steeping time of 0–7 hr. Structural changes in the outermost 10% layers, the subsequent 10%, and the remaining 80% of the endosperm as a function of the steeping time were studied using scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction, and differential scanning calorimetry (DSC) techniques. SEM images revealed that soft and hard endosperm have different shapes and packing factors. The X-ray diffraction patterns of the hard and soft endosperm from raw corn suggest that the hard endosperm consists mainly of amylopectin and has a bigger relative crystallinity quality than the soft endosperm. Samples cooked at 72 and 92°C with and without the Ca(OH)₂ and steeped for 0, 3, and 7 hr, showed structural changes, X-ray diffraction patterns from the outermost 10% layers and subsequent 10%

of the endosperm were completely amorphous. This fact is related to the total or partial gelatinization of the starch. The crystallinity in the internal layers of endosperm (remaining 80%) did not have significant changes after the treatments and exhibited the characteristic patterns of crystalline amylose and amylopectin. DSC measurements in the outermost layers of the endosperm did not exhibit the characteristic endothermic peak of starch (from 64 to 81°C) compared with the raw sample, while the endotherm peak for 80% of the endosperm internal layers appears in all cases (72 and 92°C). According to these results, a new definition of the nixtamalization process can be developed as follows. During the nixtamalization process 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.

Nixtamalization is used to produce many staples food such as tortillas, tortilla chips, and snacks, among others. During the alkaline treatment (cooking and steeping) of corn kernel, one of the most important processes is the diffusion of water and calcium ions into the corn kernel. This process produces important physicochemical changes in the anatomical structures of the corn kernel: pericarp, endosperm, and germ, which are reflected in the nutritional and sensorial properties of the final products (Bressani et al 1990; Serna et al 1990; Rodríguez et al 1996; Sefa-Dedeh et al 2004).

The high consumption of maize, especially in Mexico, Central America, and the southern part of United States, and the well-known lysine and tryptophan deficiencies in maize protein, create the necessity to develop maize with high quality protein, (QPM). The conversion of maize into tortilla or instant corn flours involves a thermo-alkaline process that changes the physicochemical and nutritional properties of the original maize. According to Bressani et al (1990), the nixtamalization process in QPM increases the Ca content; they found that the protein quality was significantly higher in tortillas than in raw maize.

The nixtamalization process has been studied over the last four decades, but little work has been done in terms of the structural

changes that take place in the whole endosperm, especially during the steeping step. The physical and chemical transformations that take place during the nixtamalization process, studied through the structural changes, can be an excellent tool to understand this complex problem. The structural changes in starch are associated with the swelling of starch granules and such processes as gelatinization, melting, pasting, and retrogradation (Dengate 1984).

Zobel et al (1988) explained the application of the term melting to starch gelatinization based on X-ray and synthetic polymer technologies. Diffraction studies show that crystalline specimens yield reflections from crystal planes. After melting, these reflections disappear and a broad halo appears, indicating a change from a crystalline to an amorphous (molten) state. There is widespread interest in the process of starch gelatinization, in which the organized granule structure is disrupted. Atwell et al (1988) defined starch gelatinization as the process that takes place when starch granules are heated in the presence of water, resulting in the disruption of molecular order within the starch granule. This process is manifested by irreversible changes in properties such as granular swelling, native crystallite melting, loss of birefringence, and starch solubilization. Atwell et al (1988) described another physical behavior of starch called retrogradation, the process wherein the molecules composing gelatinized starch begin to reassociate, leading to a more ordered structure. Under favorable conditions, the ordered structure may develop into crystalline forms. This phenomenon is related to the stability of a starch paste during storage annealing.

A review of the classification of native starch was published recently by Sajilata et al (2006). This study classified several types of starches designated as A-type, B-type, C-type, and an additional form called V-type. These starches have been identified based on X-ray diffraction patterns. The A-type is characteristic of the cereal starches, the B-type of tuber and high-amylose starches and retrograded starch. The C-type, which is a mixture of A- and B-type diffraction patterns, has also been identified as characteristic of many legume starches. The V-type applies to single helices of amylose cocrystallized with other compounds such as iodine or lipids.

Using X-ray diffraction, Gomez et al (1991) studied the structural changes of nixtamalized corn flours used to prepare tortilla and tortilla chips. They found that during the production of nixta-

¹ Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, DF, México.

² Facultad de Ciencias Naturales, Licenciatura en Nutrición, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qto, México.

³ Posgrado en Ingeniería, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Qto, México.

⁴ Facultad de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, México.

⁵ Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Departamento de Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Qto, C. P. 76230, A. P. 1-1010, C. P. 76000, México.

⁶ Instituto de Investigación en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México.

⁷ Unidad de Biotecnología, Campo Experimental Bajío, INIFAP, Celaya, Celaya, Gjo, México.

⁸ Universidad Nacional de Colombia y Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Física, Manizales, Caldas, Colombia.

⁹ Corresponding author. E-mail: marioga@fata.unam.mx

malized corn flours there are few changes in the organization of starch polymers. They also found that the crystallinity of starch in masa was similar to that of raw corn but with a better recrystallization pattern, even though the corn in masa had been alkaline-cooked, steeped, and ground. In this study, evaluation of the particles was made without taking into account their morphological origin. This means that the particles can be located in the external or internal layers of the endosperm. According to Gomez et al (1992), the cooking step disrupted the crystalline structure of the corn starch, and the starch recrystallization and annealing occur during the steeping step. This study was focused on the crystalline changes of the whole endosperm.

During the nixtamalization process, the calcium content of the maize kernels in the corn cultivar Toluca rises from 0.06% in the untreated dry kernel to >0.32% in the nixtamalized kernels after steeping for 24 hr (w/w, db) (Fernandez et al 2002) and from 0.06% in the native QPM corn kernel to 0.21% in nixtamalized corn kernels after 15 hr of steeping time (w/w, db) (Gutierrez et al 2007).

Rodriguez et al (1995, 1996) studied the changes in the physicochemical properties of nixtamalized corn flours and tortillas with calcium concentration between endogenous (0.07%) and 0.5%. For tortillas containing calcium at 0–0.25% (w/w), the thermal diffusivity, peak viscosity, and crystallinity increased when the calcium content increased. This means that the physicochemical properties of these products are dependent on calcium content. The opposite trend was observed for calcium content >0.25%. In corn flours, it was found that the viscosity increases if the calcium content increases to 0.25%; the opposite trend was found for instant corn flour with high calcium content. More recently, Ramos et al (2004) studied three different corn cultivars (Celaya, Toluca, and Palomero). They showed that the rate of hydration is strongly affected by the grain integrity and this fact could influence the physicochemical changes in the different components of the corn kernels. These authors also reported that the water diffusion coefficient has thermal dependence.

Changes in the crystallinity behavior in the endosperm of nixtamalized corn were analyzed using X-ray diffraction by Mondragon et al (2004). They reported a change in the relative crystallinity of starch structure with lime concentration and steeping. They also suggest that, during nixtamalization, amylose-lipid complexes are developed in the starch, which is supported by the X-ray diffraction patterns.

Another widely used method for studying the structural properties of the starch is differential scanning calorimetry (DSC). This technique is particularly well suited for investigating the phase transition of starch and water systems because it allows the study of starch gelatinization over a wide range of starch and water ratios, the determination of gelatinization temperatures at >100°C, and the estimation of transition enthalpies. The order-disorder transitions that occur on heating an aqueous suspension of starch granules have been extensively investigated using DSC (Lelievre and Mitchell 1975; Donovan 1979; Jenkins 1994). Starch transition temperatures and gelatinization enthalpies measured by DSC may be related to characteristics of the starch granule such as degree of crystallinity (Krueger et al 1987). Gelatinization temperatures and enthalpies associated with the gelatinization endotherms vary for different corn starches. Sandhu et al (2004) observed that the transition temperatures of normal corn starches are 64.0–76.8°C.

During nixtamalization, starch undergoes functional and structural changes that depend not only on corn characteristics but also on processing conditions. Analytical methods that evaluate pasting and thermal properties have been used to investigate changes in starch during nixtamalization (Robles et al 1988; Gomez et al 1991; Almeida et al 1997). Sahai et al (1999) reported that DSC can be a useful indicator for determining the degree of cook as well as for evaluating the impact of processing conditions on nixtamalized products. Yglesias et al (2005) investigated the thermal

properties of ground raw corn, freeze-dried nixtamal, and masa at different cooking temperatures (86–96°C) and steeping times (3–11.77 hr). Nevertheless, they did not study the relationship between the calcium content and the DSC enthalpy peak. These authors concluded that nixtamal DSC enthalpy was affected mostly by steeping time, while masa enthalpy was affected exclusively by cooking temperature. Krueger et al (1987), Robles et al (1988), and Sahai and Jackson (1999) suggested that endotherm peak temperatures and enthalpy values were greatly influenced by steeping time due to the annealing phenomenon that takes place at near gelatinization temperatures. However, all these studies were made considering corn kernel as an entire system. It is very important to emphasize that the corn kernel consists of different anatomical structures (pericarp, germ, and endosperm) and it is necessary to take into account that the endosperm consists of soft and hard layers with different packing factors and chemical composition. These criteria were not accounted for in previous research.

This work presents a complete study of the structural changes in the endosperm that take place during the traditional nixtamalization process as a function of the steeping time from 0 to 15 hr for samples cooked at 72 and 92°C using scanning electron microscopy, differential scanning calorimetry, and X-ray diffraction. The analysis was done in the 10% of the outermost layers, the subsequent 10%, and the remaining 80% of the endosperm.

MATERIALS AND METHODS

QPM Material

The Quality Protein Maize (QPM) hybrid H-368C was produced by the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) and Centro de Investigación para el Mejoramiento del Maíz y del Trigo (CIMMYT). The maize was sown on May 2004 at the Bajío Experimental Station (INIFAP) in Celaya, Guanajuato, México. Crop management followed INIFAP recommendations. Ears were hand-harvested in November 2004 and the grain was stored at 4°C until used.

Chemical Composition

Moisture content of corn kernels before and during the cooking step was determined using Method 925.10 and Method 920.86 for crude fiber content (AOAC International 2000). Ash content, protein content, and fat content were measured using Approved Methods 08-01, 46-13, and 30-25 (AACC International 2000), respectively. All the measurements were made in triplicate.

Soft and Hard Endosperm Determination

To determine the amount of soft and hard endosperm, the pericarp and germ were manually removed after soaking corn kernels in distilled water for 3 hr. The kernels were stirred in a 250-mL beaker using a hot plate without temperature. Then the corn was dried at 40°C for 2 hr and finally the soft-to-hard endosperm ratio was calculated. The endosperm, soft and hard, was weighed, and the soft endosperm was carefully removed using a low-speed dental precision hand instrument (COA, International) equipped with a bur diamond.

Corn and Endosperm Hardness

The corn and endosperm hardness was determined in 100 corn kernels using a texture analyzer (model TA-XT2 Texture Technologies Corp, Scarsdale, NY) to determine the breaking force required for different samples of corn kernels. The same test was made on soft and hard endosperm. The area under the force-deformation curve was analyzed with texture analyzer software as reported by Martínez-Bustos et al (1999).

Corn Nixtamalization

For better control of the nixtamalization process for the cooking and steeping steps, as well as reproducibility of the samples, a

nixtamalization computer controlled process (NCCP) was developed to control the cooking temperature and to monitor temperature for the cooking and cooling steps in real time (Gutierrez et al 2007). In the initial cooking step of the nixtamalization process, each sample was prepared by cooking 3 kg of QPM H-368C kernels in a solution of 6 L of distilled water and 30 g of calcium hydroxide (1%, w/w) (reagent powder, Fermont, Monterrey, NL, México). The corn kernels were added to the container and heated to the respective reference temperatures for each treatment. The sample remained in the container at this temperature for a characteristic cooking time that depends on the cooking temperature: 65 min for 72°C and 25 min for 92°C. These temperatures were calculated according to the final moisture content at the end of the cooking step (36%) and the manual removal of the pericarp. After the cooking step, the system was turned off and the temperature gradually decreased. The temperature changes were monitored until the sample reached the chosen steeping time to begin the washing process. Maize kernels were cooked at 72 and 92°C at 65 and 25 min, respectively. After cooking, the maize was steeped for 0–15 hr. The cooking liquor (nejayote) was drained off and the nixtamal samples were washed twice in water (distilled water was used to avoid Ca interference) using a 2:1 (v/w) ratio by stirring the kernels in the wash water for 1 min. After washing, the pericarp, endosperm, and germ of each soaked kernel were separated manually and dried using an air oven at 40°C for 8 hr (each component reached a relative moisture content of 12%). As the endosperm constitutes ≈80% of the whole kernel, the outermost 10% and the subsequent 10% of the dry undamaged endosperm were removed manually, one kernel at a time, by sanding all faces with sandpaper (Fandeli, Sic B-99, 1200) following the procedure reported by Fernandez et al (2004).

Corn Samples Characterization by Low-Vacuum Scanning Electron Microscopy (LV-SEM)

The morphologic analysis of the endosperm in each sample was performed with low-vacuum scanning electron microscopy (LV-SEM, JSM 5600LV) with a resolution of 5 nm in LV mode, fitted with an energy dispersive X-ray spectrometer (Noran instrument, model Voyager 4.2.3). Before analysis, the corn samples were fixed on the specimen holder with carbon tape mounted on an alumi-

num specimen holder. The analysis was performed using 20 kV electron acceleration voltage and 12–20 Pa pressure in the specimen chamber, obtaining the images on the fracture surfaces with the backscattering electron signal.

X-ray Diffraction Characterization

The X-ray diffraction patterns of amylose (Sigma Chemical A-7046), amylopectin (Fluka BioChemika AG 10120), soft and hard endosperm of QPM nixtamalized endosperm as function of the steeping time, as well as the different layers of the undamaged nixtamalized endosperm (10, 10, and 80%) were collected. The samples were ground into a fine powder and passed through a 150- μm screen. The samples in powder form were then densely packed into an aluminum frame. The X-ray diffraction patterns of the samples were recorded on a diffractometer (Siemens D5000) operating at 35 kV and 15 mA, with a Cu K_{α} radiation wavelength of $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$, and from 4° to 30° on a 2 θ scale with a step size of 0.05°. The measurements were performed at room temperature.

Differential Scanning Calorimetry

The first sanding (10%), second sanding (10%), and the 80% remaining of the endosperm (9.1% moisture content) were investigated using DSC (Q100, TA Instruments). A known weight of indium standard was used in the reference pan to balance the heat capacity of the sample pan. Samples (10 mg) were accurately weighed (Ohaus, Voyager) into stainless steel pans (900793.901, TA Instruments) hermetically sealed, hydrated with 55 μL of distilled water and heated from 30 to 110°C at a rate of 5°C/min. All the analyses were performed in a nitrogen atmosphere to 300 kPa (3 atm) internal pressure. Enthalpy of transition (ΔH) was calculated using software for the Universal Analysis 2000 TA Instruments. DSC measurements were made in three replicates and the mean values are reported for all samples.

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical proximate analysis of the corn kernels without thermo-alkaline treatment was moisture content 12.1%, ash 1.34, protein 6.66%, lipid 5.12%, and crude fiber content 11.3%. Corn hardness was $14.82 \pm 1.34 \text{ KgF}$. In addition, hard and soft endo-

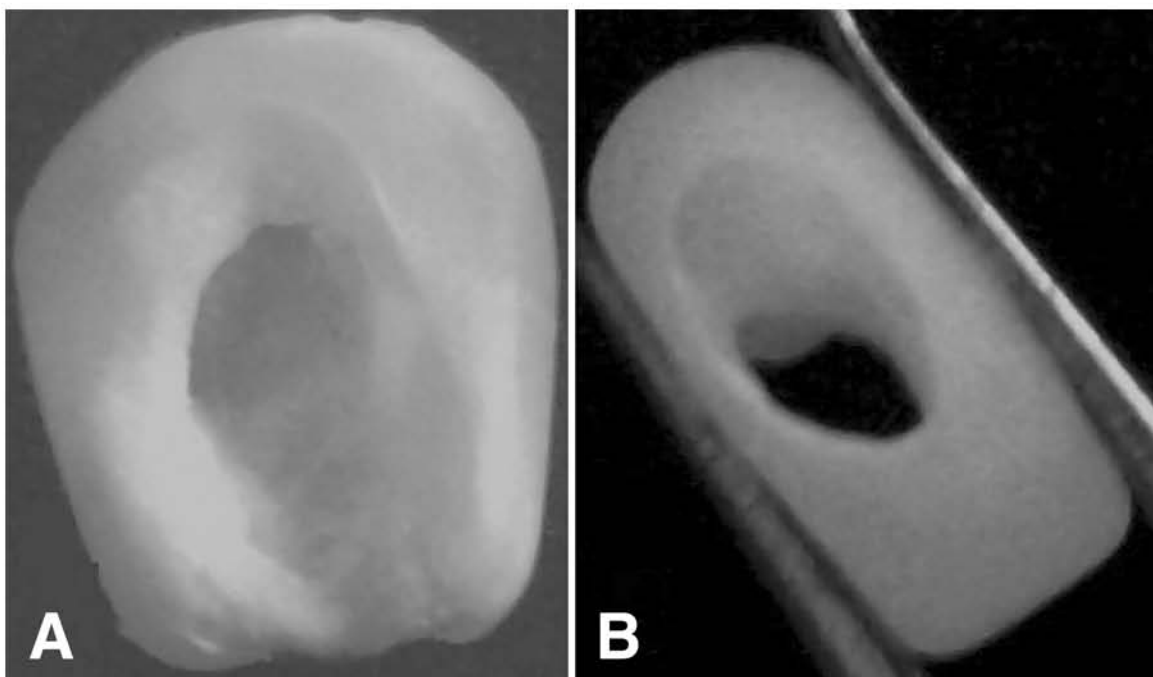


Fig. 1. **A**, Frontal view of uncooked endosperm of QPM H-368. **B**, Upper view of corn kernel. Holes show location of soft endosperm and germ.

sperm hardness was measured in the same kernels, where values were 12.44 ± 1.11 and 7.99 ± 1.24 KgF, respectively. It is well known that the endosperm content of corn kernels varies from 75 to 85%. The endosperm is mainly formed by starch present as clusters of starch granules covered by a protein matrix in two different packing forms (soft and hard endosperm). The soft and hard endosperm are distributed in the corn kernels in different regions. In QPM H-368, the soft endosperm is located in the top of the corn kernel and behind the germ from the top the tip cap (Fig. 1A and B). Holes in these figures show the location of the soft endosperm that was removed and also the germ. These figures represent total hard endosperm of the uncooked corn kernels. According to the methodology used to obtain the soft and hard endosperm, the soft endosperm constitutes $\approx 20.82 \pm 1.5\%$, and the remainder is hard endosperm. Usually the ratio of soft to hard endosperm depends on the type of corn. For the dent corn the ratio is 2:1 (Wolf et al 1952).

The soft (floury) and hard (corneous) endosperm ratio is a very important parameter for thermo-alkaline processes because during the cooking and steeping steps, the changes in these structures influence the structural, rheological, textural, and mechanical properties of the nixtamalized products (Rodriguez et al 1995, 1996; Fernandez et al 2002, 2004). SEM images gave a better understanding of the starch changes of the hard and soft endosperm of the uncooked corn kernels. Figure 2A and B show starch granules corresponding to the hard endosperm. Figure 2C and D show the soft endosperm. It is evident that the starch granules of the endosperm are randomly packed; thus, it is not possible to find order in a short range. The packing factor for a random system is defined as the volume fraction occupied by disordered arrays of macroscopic or microscopic particles in contact with one another (Zallen 1998). In the hard endosperm the fraction is bigger than in the

soft endosperm. It is possible to see that the shape of soft starch granules is almost spherical, while the hard endosperm exhibits polygonal shapes. The origin of these structures according to Saas et al (1977) is caused by the cell division in the corn kernel. This work also suggests that the less mature cells in the soft (floury) endosperm, located in the central core (Fig. 1), have lower amylose content than cells in the surrounding hard endosperm. These figures are important in the nixtamalization process because the packing factor affects the calcium and water diffusion into the corn kernels.

The endosperm is mainly formed by starch (amylose and amylopectin) and the structural configuration of these polymers can be studied through X-ray diffraction patterns. Figure 3 shows the X-ray diffraction patterns of amylose, amylopectin, and starch of corn without treatment. The amylopectin exhibits the best relative crystallinity quality, while amylose constitutes the less crystalline phase of the starch. The relative crystallinity quality is calculated by normalizing the integrated diffracted intensity over the measured 2θ range to the integrated noncoherent intensity, which is obtained by subtracting the sharp diffracted peaks from the total diffracted intensity (Rodriguez et al 1995, 1996). The relative crystallinity values of amylopectin and amylose were 37 and 22%, respectively. Clearly, the amylopectin macromolecules in the starch granules have a better crystalline order than does amylose.

Figure 4 shows the X-ray diffraction patterns of the hard and soft endosperm from the raw corn (QPM H-368). It is possible to determine that the hard endosperm has a better relative crystallinity quality than the soft endosperm. This could be explained in two ways: the first one relates to the packing factor of starch granules, and the second one refers to the fact that the hard endosperm is mainly amylopectin. Unfortunately there is no accepted defined X-ray diffraction pattern in the International Centre for diffraction

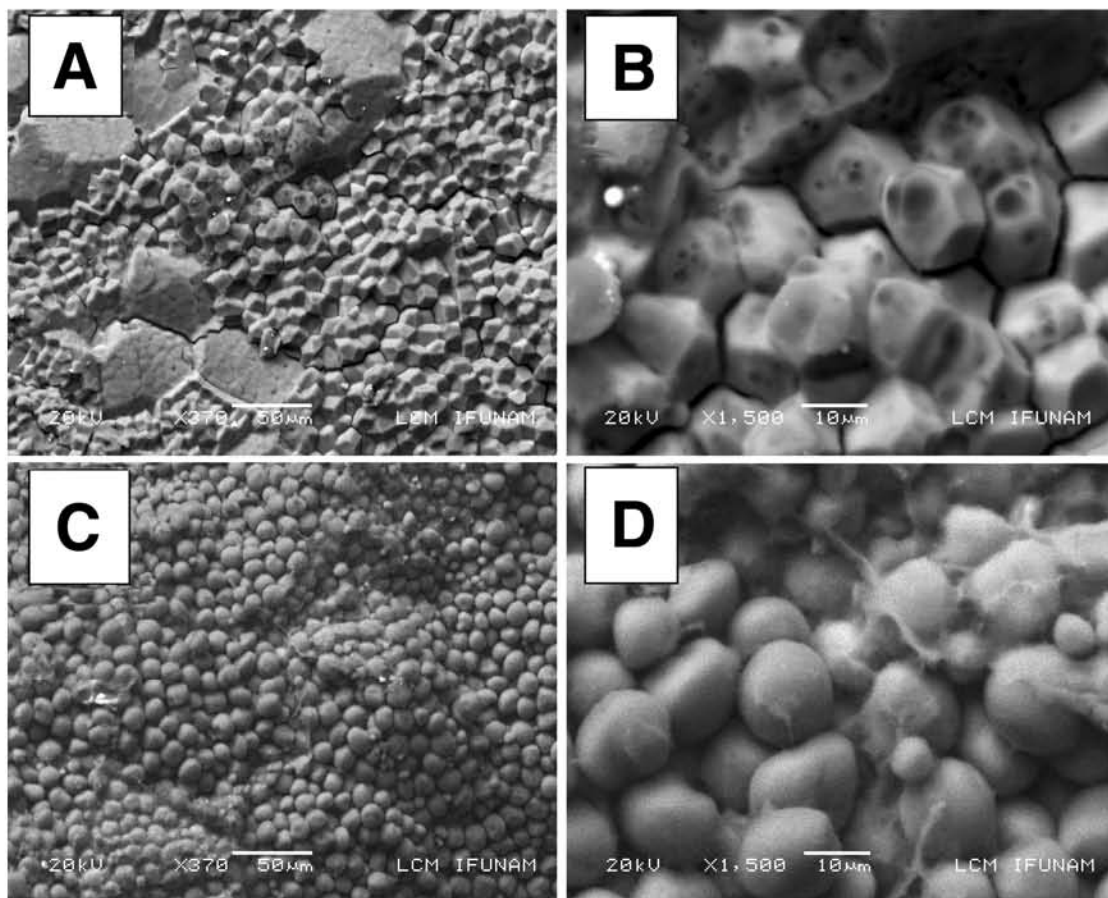


Fig. 2. SEM images of QPM H-368 taken at 350 \times and 1,500 \times . A and B, hard endosperm. C and D, soft endosperm.

data to compare the X-ray diffraction patterns. By direct inspection of Figs. 3 and 4, it is possible to determine that the hard endosperm could be formed mainly of amylopectin. This is the normal way to identify structures using X-ray diffraction data. According to powder diffraction data for amylose (α -amylose 43-1858) (JCPDS-International Centre for Diffraction Data 1997) (Imberty et al 1988), this structure does not exhibit the peaks located at 15.214 ($d = 5.8191 \text{ \AA}$), 21.154 ($d = 3.8382 \text{ \AA}$) in the 2θ scale that are characteristic for the amylopectin identification. These results agree with previous works reported by Gibbon et al (2003) for QPM lines where X-ray diffraction showed that QPM corns are rich in amylopectin.

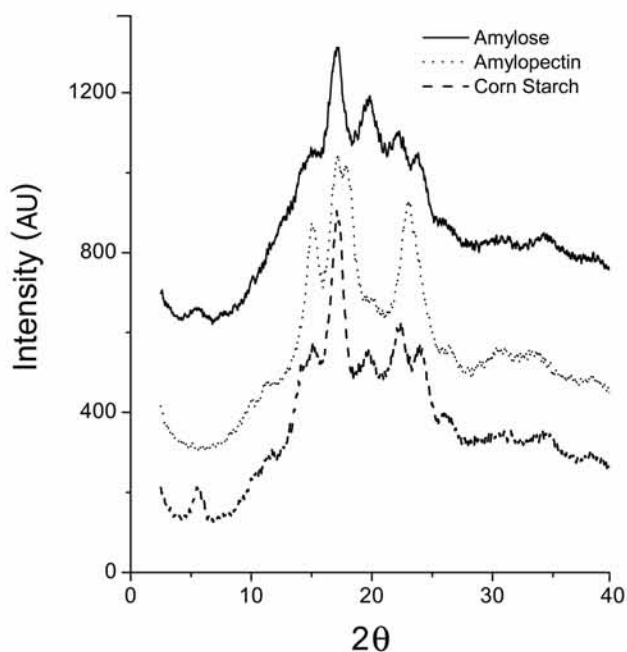


Fig. 3. Characteristic X-ray diffraction patterns of amylose, amylopectin, and corn starch.

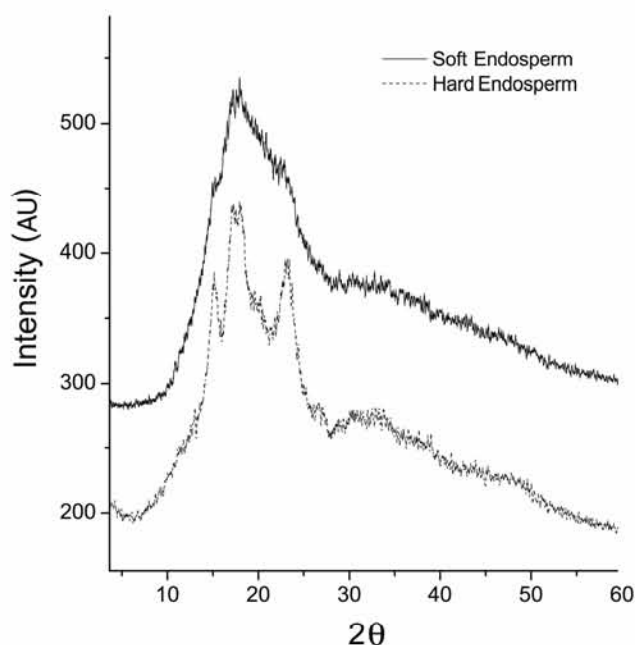


Fig. 4. Characteristic X-ray diffraction patterns of soft and hard endosperm from QPM H-368 without treatment.

As mentioned earlier, this work considers the endosperm as a multilayer system. It is important to study the structural configuration using X-ray diffraction. Figure 5 shows the characteristic X-ray diffraction patterns of corn endosperm without the thermo-alkaline treatment taken as the 10% of the outer layers, subsequent 10%, and the remaining 80%. These patterns correspond to the amylopectin structure (Fig. 3). X-ray diffraction data is a useful and unequivocal tool to structural identification of any crystalline material.

The structural transformation that takes place in the endosperm due to the thermal and thermo-alkaline treatment was studied using DSC and X-ray diffraction techniques. Taking into account that during the cooking and the steeping steps there is a simultaneous water and calcium ion diffusion, it is reasonable to think that the outermost layers of endosperm undergo the initial changes that can be reflected in the structure of the starch granules and on the internal order of amylose and amylopectin.

One of the most important points of this work is the necessity of structural analysis considering the morphology of the endosperm and the fact that the calcium and water diffusion processes take place from the external to the internal layers of the endosperm, producing structural changes as a function of the endosperm position. Fernandez et al (2004) studied the calcium content in the anatomical components of the corn kernels and they were able to determine the calcium content in the pericarp, germ, and endosperm. Their studies were focused into the calcium ion content of the outermost 10%, subsequent 10%, and remaining 80% of this structure. Their results revealed that the calcium is present mainly in the most external layers of the endosperm. However, they did not study the structural changes in anatomical structure.

It is very important to study the structural changes that take place in the endosperm following the changes in the amylose and amylopectin of nixtamalized corn kernels as a function of the steeping time, focusing on the structural changes as function of deep endosperm.

In Fig. 1, the outermost 10% of the endosperm of QPM H-368 maize is hard endosperm, which according to the X-ray diffraction pattern of Fig. 4, exhibits a crystalline phase corresponding to amylopectin (Fig. 3).

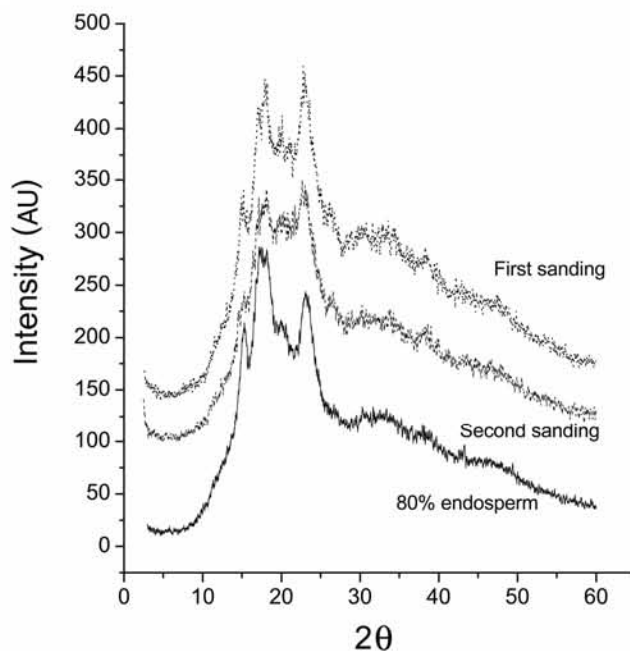


Fig. 5. Representative X-ray diffraction patterns of the 10% outermost layers, subsequent 10% layers and the remaining 80% of the endosperm of corn kernel without any treatment.

Figure 6 shows the X-ray diffraction patterns of the outermost 10%, subsequent 10%, and the remaining 80% of the endosperm after the thermal treatment (72°C). For this purpose, the corn kernel was cooked in water without calcium hydroxide. The X-ray diffraction patterns show that the thermal treatment produces important changes in the most external layers of the endosperm. The starch from this region after this treatment is completely amorphous. On the other hand, the crystallinity in the internal layers of endosperm did not change significantly after the thermal process. For samples cooked up to gelatinization temperature, it is well known that there is total or partial gelatinization of the starch (with appropriate water content) that produces order disruption in the amylose and amylopectin and, as a result, produces loss of the crystalline quality. However, the remaining 80% of the endosperm exhibits a good crystalline quality and a characteristic pattern of amylopectin (Fig. 3). This fact could be related to the low moisture content of the internal endosperm (Almeida et al 1997). The same behavior was found for samples cooked at 92°C.

One important point is the study of the evolution of the crystalline quality of the endosperm as a function of the steeping time for nixtamalized samples. Figure 7A–C shows the X-ray diffraction patterns of the outermost 10%, subsequent 10%, and remaining 80% of the endosperm for nixtamalized samples steeped for 0, 3 and 7 hr at 72°C cooking temperature. The 20% of the external endosperm (hard endosperm) exhibits structural damage reflected in characteristic X-ray amorphous patterns, while in the remaining 80% of the endosperm, the X-ray diffraction patterns exhibit crystallinity as in Fig. 3. It is evident that the amylopectin and amylose content after thermo-alkaline processing in this part of the endosperm change significantly, even at the highest temperature treatment.

Figure 8A shows the X-ray diffraction patterns of the outermost 10% of the layers of the endosperm for samples nixtamalized at 92°C (first sanding) and Fig. 8B shows the second sanding for samples steeped at 0, 3, and 7 hr. In Fig. 8A and B, the outermost layers are amorphous, while in the X-ray diffraction patterns of the internal endosperm (Fig. 8C), the X-ray diffraction patterns exhibit crystallinity. The same experiments were conducted for different steeping times at 0–15 hr and exhibited the same trends.

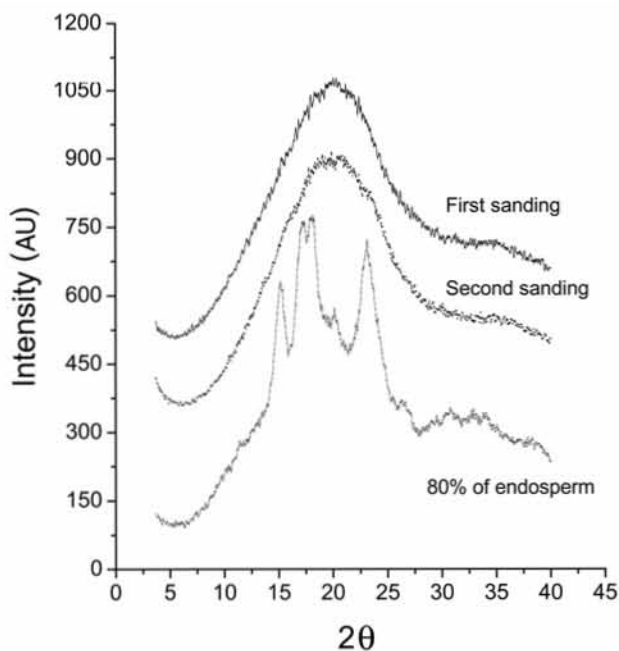


Fig. 6. X-ray diffraction patterns of the 10% outermost layers, subsequent 10% layers, and the remaining 80% of the endosperm of corn kernel with thermal treatment at 72°C.

Crystallization corresponds to the phase in which a system goes from amorphous to ordered system with long or short order. This means that the system has crystalline or polycrystalline phases, while in recrystallization, it occurs when the system recovers or improves crystalline order. In the starch-water system, recrystallization depends on the water content. This process is also time-dependent due to the water bond dependence of the system. According to Figs. 7 and 8, the recrystallization process does not take place in the outermost layers of the nixtamalized endosperm.

Ramos et al (2004) showed less diffusion of water in the internal layers of the endosperm. Almeida et al (1997) reported the relationship between kernel properties and alkaline cooking characteristics of corn with different kernel characteristics. They found that the hard corn endosperm particles consistently required a longer time for hydration and gelatinization of starch. Previous works reported by Gomez et al (1991, 1992) using X-ray diffraction showed that the nixtamalization process produces few changes in the organization of starch polymers. By analyzing the X-ray diffraction patterns of the raw corn, nixtamal, masa, tortilla, and tortilla chips, they concluded that cooking reduces the intensity of the major peaks, indicating that crystalline starch structure was partially disrupted. In the foregoing works, the authors used whole corn kernel for the X-ray diffraction patterns. Changes in some structures with different locations in the endosperm were not detected by this technique. For this reason, the X-ray patterns in these works did not detect the presence of completely amorphous zones from the whole endosperm.

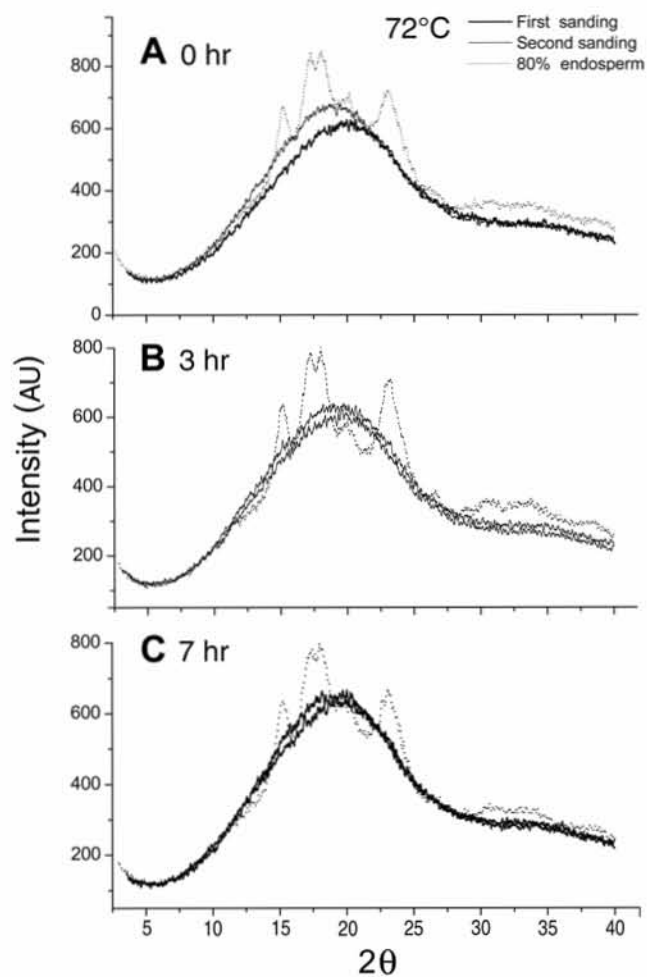


Fig. 7. A, X-ray diffraction patterns of the 10%; B, subsequent 10%; and C, remaining 80% of the endosperm for samples steeped for 0, 3 and 7 hr at 72°C cooking temperature.

The X-ray diffraction study performed on the endosperm showed that the outermost layers of this structure presented a melting or gelatinization phenomenon due to the thermo-alkaline process, which is reflected in the amorphous patterns (Figs. 6, 7, and 8). To confirm the gelatinization process in the outermost layer of the endosperm, due to the thermal and thermo-alkaline processing, DSC measurements were made in samples cooked at 72 and 92°C.

Figure 9A–C shows the DSC analysis of samples cooked at 72°C and steeped for 0, 3 and 7 hr. Figure 9A shows the DSC of the outermost 10% layers of the endosperm (first sanding). It is clear that the samples from this region of the endosperm do not exhibit the characteristic endothermic peak at 64–81°C (Sandhu et al 2004). The peak for the outermost 10% of the endosperm layers without any treatment under the same conditions was found at 72.91°C, which reflects the melting point of the starch or the gelatinization event. It means that, due to the nixtamalization process, these samples were already gelatinized, as confirmed by X-ray diffraction data shown in Fig. 7A–C. Figure 9B shows the DSC of the subsequent 10% of the endosperm (second sanding); the starch from this region also was gelatinized. Figure 9C shows the DSC of the remaining 80% of the endosperm. It is interesting to see that for 0, 3 and 7 hr of steeping, these samples exhibit the characteristic endothermic peak, which reflects some starch damage.

Figure 10A–C shows the DSC analysis of samples cooked at 92°C and steeped for 0, 3 and 7 hr. By direct comparison with Fig. 9, it is possible to establish that the most internal layers of the endosperm exhibit the characteristic endothermic peak, and by

inspection of Fig. 8.C, the origin of this peak could be due to the remaining crystallinity of amylose and amylopectin after thermo-alkaline processing. According to X-ray diffraction patterns shown in Figs. 7 and 8, and the DSC analysis of the outermost layers of endosperm, this structure presented a melting or gelatinization phenomenon due to the thermo-alkaline process.

CONCLUSIONS

According to the results of this study, the QPM H-368 corn kernel consists mainly of hard endosperm, representing 80% of its structure. The soft and hard endosperm exhibit different packing factors and shapes (Fig. 2). The X-ray diffraction patterns showed that hard endosperm could consist mainly of amylopectin. There is no report of an accepted X-ray diffraction pattern for amylopectin so it is not possible to compare patterns, while soft endosperm is mainly formed by amylose according to the X-ray diffraction pattern reported by Imberty et al (1988). The origin of the crystalline structure of the studied corn kernels comes from the amylopectin present in the starch granules (Fig. 3).

The X-ray diffraction patterns of the outermost layers of the endosperm for samples cooked at 72 and 92°C showed that these structures had been disrupted as result of the thermal and thermo-alkaline processing, and that the most internal layers of the endosperm exhibit crystalline phases coming from the crystalline region of amylose and amylopectin.

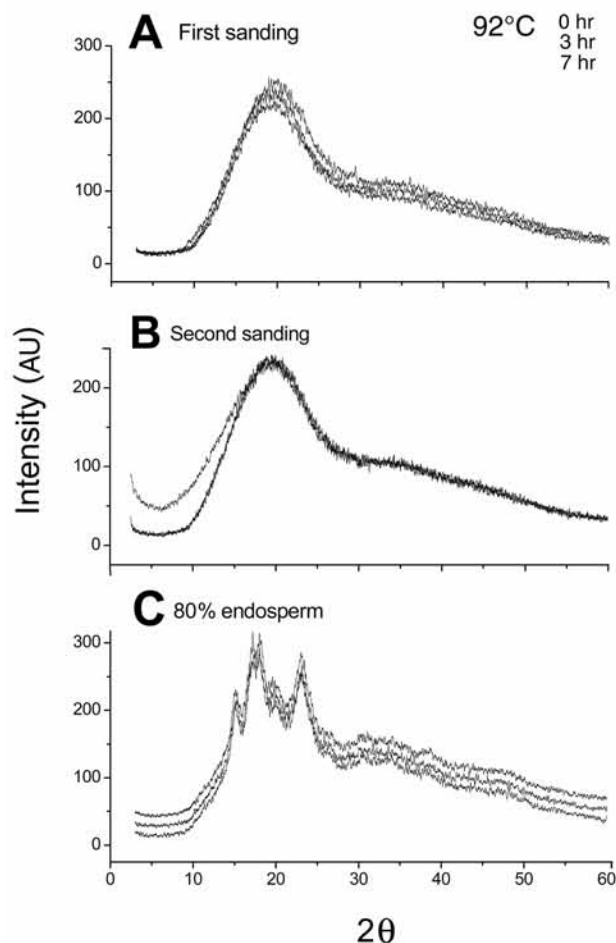


Fig. 8. A, X-ray diffraction patterns of the first sanding (outermost 10%); B, second sanding (subsequent 10%); and C, remaining 80% of the endosperm for samples steeped for 0, 3 and 7 hr and cooked at 92°C.

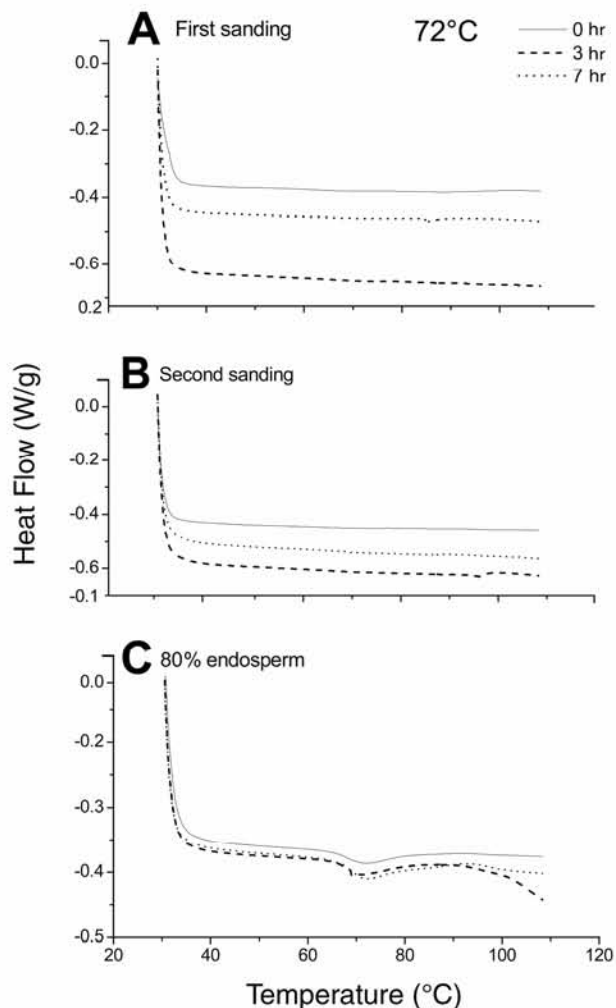


Fig. 9. DSC thermograms of samples steeped for 0, 3 and 7 hr and cooked at 72°C. A, first sanding (outermost 10%); B, second sanding (subsequent 10%); and C, remaining 80% of the endosperm.

LITERATURE CITED

The thermal treatment in water amorphizes the most external layers of the endosperm ($\approx 20\%$). The nixtamalization process in the 72–92°C range produces the total gelatinization and melting of the starch of the most external layers of the endosperm and the partial disruption of the internal order in the most internal layers of the endosperm, according to the X-ray diffraction patterns and the DSC measurements in these structures. These results disagree with all previous reports (Gomez et al 1991, 1992), in which the crystalline starch structure was considered to be partially disrupted during the nixtamalization process by the analysis of the whole endosperm, while these studies were focused on different layers of this structure.

Finally, according to the X-ray diffraction and DSC results, a new definition of the nixtamalization process can be proposed: during the nixtamalization process, there is a total gelatinization of the starch granules of the most external layers and partial gelatinization of the most internal layers of the endosperm.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially supported by CONCyTEQ, Querétaro, México. We want to thank M. en C. Roberto Hernandez Reyes (Instituto de Física-UNAM) and M. en C. Ma. de los Angeles Cornejo (FESC-UNAM) for their technical support.

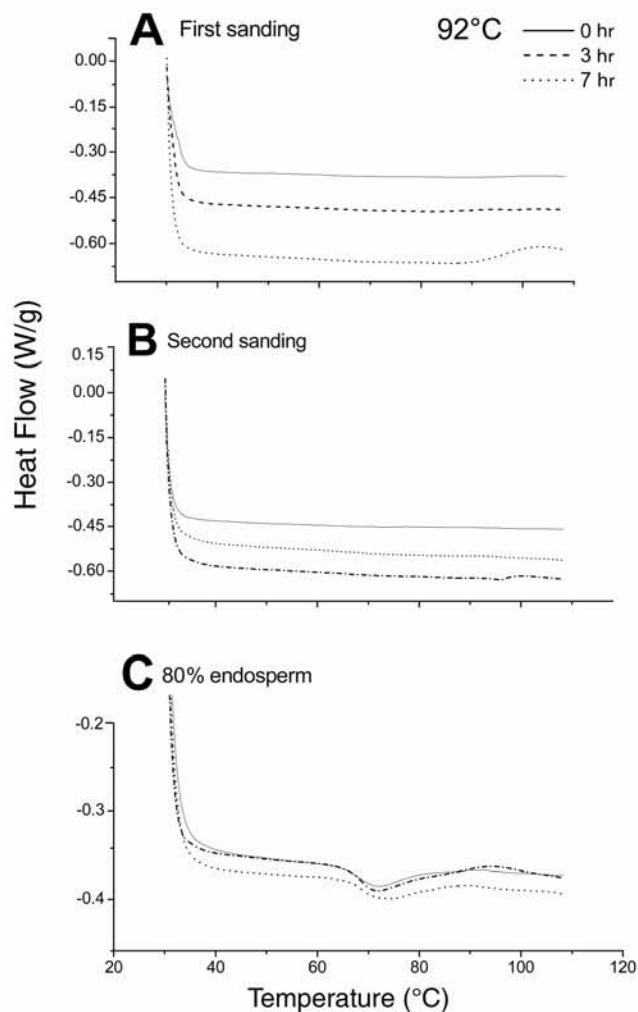


Fig. 10. DSC thermograms of samples steeped for 0, 3 and 7 hr and cooked at 92°C. **A**, first sanding (outermost 10%); **B**, second sanding (subsequent 10%); and **C**, remaining 80% of the endosperm.

- AACC International. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed. Methods 08-01, 30-25, and 46-13. The Association: St. Paul, MN.
- Almeida-Dominguez, H. D., Suhendro, E. L., and Rooney, L. W. 1997. Corn alkaline cooking properties related to grain characteristics and viscosity (RVA). *J. Food Sci.* 62:516-523.
- AOAC International. 2000. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th Ed. Methods 920.86 and 925.10. The Association: Gaithersburg, MD.
- 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.
- Bressani, R., Benavides, V., Acevedo, E., and Ortiz, M. A. 1990. Changes in selected nutrient content and in protein quality of common and quality protein maize during tortilla preparation. *Cereal Chem.* 67:515-518.
- Dengate, H. N. 1984. Swelling, pasting, and gelling of wheat starch. Pages 49-82 in: *Advances in Cereal Science and Technology*, Vol. VI. Y. Pomeranz, ed. AACC International: St. Paul, MN.
- Donovan, J. W., Lorenz, K., and Kulp, K. 1979. Differential scanning calorimetry of heat-moisture treated wheat and potato starches. *Cereal Chem.* 60:381-387.
- Fernández-Muñoz, J. L., Rodríguez, M. E., Pless, R., Martínez-Flores, H. E., Leal, M., Martínez, J. L., and Baños, L. 2002. Changes in nixtamalized corn flour dependent on the post-cooking time. *Cereal Chem.* 79:162-166.
- Fernández-Muñoz, J. L., Rojas-Molina, 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.* 81:65-69.
- 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. USA.* 100:15329-15334.
- Gomez, M. H., Waniska, R. D., and Rooney, L. W. 1991. Starch characterization of nixtamalized corn flour. *Cereal Chem.* 68:578-582.
- Gomez, 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.* 69:275-279.
- González, R., Reguera, E., Mendoza, L., Figueroa, J. M., and Sánchez-Sinencio, F. 2004. Physicochemical changes in the hull of corn grains during their alkaline cooking. *J. Agric. Food Chem.* 52:3831-3837.
- 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 the cooking temperature. *Cereal Chem.* 84:186-194.
- 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.
- Jenkins, P. 1994. X-ray and neutron scattering studies on starch granule structure. PhD thesis. University of Cambridge: Cambridge, UK.
- 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.
- Lelievre, J., and Mitchell, H. 1975. A pulsed NMR study of some aspects of starch gelatinization. *Starch* 27:113-115.
- 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.
- Mondragón, M., Bello-Perez, L. A., Agama, E., Melo, A., Betancur-Ancona, D., and Peña, J. L. 2004. Effect of nixtamalization on the modification of the crystalline structure of maize starch. *Carbohydr. Polym.* 55:411-418.
- Ramos, G., Pezet-Valdez, M., O'Connor-Sánchez, A., Placencia, C., and Pless, R. C. 2004. Hydration rates for various types of Mexican maize based on single-kernel measurements. *Cereal Chem.* 81:308-313.
- Robles, R. R., Murray, E. D., and Paredes-Lopez, O. 1988. Physicochemical changes of maize starch during the lime-cooking treatment for tortilla making. *Int. J. Food Sci. Technol.* 23:1-98.
- Rodríguez, M. E., Yáñez-Limón, J. M., Cruz-Orea, A., Alvarado-Gil, J. J., Zelaya-Ángel, O., Sánchez-Sinencio, F., Vargas, H., Figueroa, J. D. F., Martínez-Bustos, F., González-Hernández, J., Martínez-Montes, J., and

- Miranda, L. C. M. 1995. The influence of the slake content on the processing conditions of cooking tortilla: Changes in thermal, structural rheological properties. *Z. Lebensm Unsters Forsch* 201:236-240.
- Rodríguez, M. E., Yáñez-Limón, J. M., Alvarado, J. J., Vargas, H., Sánchez-Sinencio, F., Figueroa, F., Martínez, B. F., González-Hernández, J., Silva, M. D., and 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.* 73:593-600.
- Saas, J. E. 1977. Morphology. Pages 89-110 in: *Corn Improvement*, 3rd Ed. G. F. Sprague, ed. Am. Soc. Agron.: Madison, WI.
- 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.* 76:850-854.
- Sajilata, M., Singhal, S. R., and Kulkarni, P. R. 2006. Resistant starch—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. CRFSFS* 5:1-17.
- 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.
- Sefa-Dedeh, S., Cornelius, B., Sakyi-Dawson, E., and Afoakwa, E. 2004. Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize. *Food Chem.* 86:317-324.
- Serna-Saldivar, S. O., Gomez, M. H., and Rooney, L. W. 1990. Technology chemistry and nutritive value of alkaline-cooked corn products. Pages 243-295 in: *Advances in Cereal Science and Technology*. Y. Pomeranz, ed. AACC International: St. Paul, MN.
- Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M., and Rist, C. E. 1952. Structure of the mature corn kernel. I. Gross, anatomy and structural relationships. *Cereal Chem.* 29:321-333.
- Yglesias, R., Parkhurst, M. A., and Jackson, D. S. 2005. Development of laboratory techniques to mimic industrial-scale nixtamalization. *Cereal Chem.* 82:695-701.
- Zallen, R. 1998. Amorphous morphology: The geometry and topology of disorder. Pages 33-51 in: *The Physics of Amorphous Solids*. John Wiley and Sons: New York.
- Zobel, H. F., Young, S. N., and Rocca, L. A. 1988. Starch gelatinization: An X-ray diffraction study. *Cereal Chem.* 65:443-446.

[Received September 15, 2006. Accepted April 4, 2007.]

GLOSARIO

Nixtamalización: Es el tratamiento que se realiza en granos de maíz con un tiempo de cocción en un medio alcalino.

Tiempo de cocimiento: Es el tiempo necesario que debe permanecer el maíz nativo en cocimiento en un medio alcalino Ca(OH)_2 para facilitar el desprendimiento manual del pericarpio.

Tiempo de reposo: Etapa que sigue a la cocción y puede variar de 0 a 24 horas para la hidratación final del grano de maíz en el agua de cocción.

Agua de nejayote: Subproducto del proceso de nixtamalización del maíz, constituido por cal y sólidos que se desprendieron del maíz durante el cocimiento.

Gelatinización: Es el colapso o disrupción del orden molecular en el interior del gránulo de almidón, que provoca cambios irreversibles en el hinchado del gránulo, fundición de cristalitos, pérdida de birrefringencia, lo que conduce a desarrollar viscosidad y solubilidad del almidón.

Pastificación: Es el fenómeno seguido a la gelatinización en la disociación de almidón. Esto involucra hinchamiento del gránulo, exudación de los componentes moleculares y eventualmente rompimiento del gránulo.

Retrogradación: Es el evento que ocurre cuando las moléculas de almidón comienzan a asociarse formando una nueva estructura ordenada después de la gelatinización.