



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Tesis

“Efecto de la extracción secuencial de fracciones proteicas en las propiedades térmicas de la harina de maíz nixtamalizado”

**Que para obtener el título de
Licenciada en Química de Alimentos**

PRESENTA

Marisol Amador Hernández

ASESORES DE TESIS

Dra. Eva María Santos López

Dr. Luis Guillermo González Olivares



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
Licenciatura de Química en Alimentos

**M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:**

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura en Química en Alimentos **Amador Hernández Marisol**, quien presenta el trabajo de investigación **“Efecto de la extracción secuencial de fracciones proteicas en las propiedades térmicas de la harina de maíz nixtamalizado”**, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

Presidente	Dra. Elizabeth Contreras López	
Primer vocal	Dra. Eva María Santos López	
Segundo vocal	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila	
Tercer vocal	Dr. Luis Guillermo González Olivares	
Secretario	Dr. Javier Castro Rosas	
Primer suplente	M. en C. Juan Ramírez Godínez	
Segundo suplente	Q.A. Andrés García Guerrero	

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
“Amor, Orden y Progreso”
Pachuca Hidalgo, 02 de abril de 2014.

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa
Coordinador Adjunto de la Licenciatura
en Química en Alimentos



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 ext. 2518
cgomez@uaeh.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

Según algunas personas, la vida está regida por cuatro leyes fundamentales que ocurren a todos a lo largo del globo. He aquí solo la primera ley:

“La persona que llega es la persona correcta, es decir, que nadie llega a nuestras vidas por casualidad, todas las personas que nos rodean, que interactúan con nosotros, están ahí por algo, para hacernos aprender y avanzar en cada situación”

Cito solo este párrafo para empezar a agradecer a aquellos que formaron parte de mi vida como estudiante y las que desde siempre han estado para mí.

Le doy la muestra más grande de agradecimiento a mi mamá quien siempre me guió, entendió, escuchó, alentó, regañó pero sobre todo creyó en cualquier cosa que yo hacía. GRACIAS por mi carrera, por mi vida...

No sé cómo agradecerle a Alfredo, mi más grande enemigo de la infancia pero mi mayor orgullo familiar, ¡eres una persona única!

Gracias a mi papá por todo, te admiro mucho y quiero que estés en mi vida para siempre.

Mito, eres mi médico favorito, gracias por los consejos y las pláticas que hemos tenido, siempre me has apoyado y espero corresponder a lo buen hermano que eres.

Isaí, eres una persona que llegó a cambiar todo mi mundo y quiero agradecerte por hacerme entender la vida, la ciencia, amar a la química y

a mí misma. Recuerda que las palabras jamás pueden llegar a gastarse y que hay combinaciones infinitas que crean frases para lograr comprender todo, ahora la única que encuentro para ti es gracias por coincidir conmigo en esta vida, Te Amo.

Agradezco a todos mis amigos que hicieron de la uni algo más relajado. A mis amigas de siempre, a Sandra la que siempre se está riendo, Helen la que nos enseñaba los paradigmas de la vida, Lucía la de los abrazos asfixiantes, siempre es un gusto estar con ustedes. Julieta: fuiste mi primera amiga de la universidad, alguien a quién podía contarle de todo, además de que juntas creamos la gran banda del carrisol y con nuestros chalanes favoritos vivimos momentos que ahora son historias para contar a nuestros nietos (sólo para eso). Joel: siempre me hacías reír y me apoyabas en todo. Amigo, eres la onda. Jamás olvidaré tu valiosa amistad y tus momentos de fiesta... creo que ese es tu segundo nombre o era porque ya eres todo un empresario. Isauro... Isauro... que podré decir de ti... con tan sólo recordarte empiezo a reír por tus tantas ocurrencias y locuras, eres mi maestro de patinaje, eres el de los apodos, el del perfil griego, el que ha regado familia por toda la uni, el que siempre se mete al slam (y se cae), el que no dejaron bajar del camión en Querétaro, hay tanto que recordar de ti porque eres el motor de la banda (o eso dices tú), te quiero amigo y sé que no vas a dejar que se cumpla la profecía de Joel. Gaby mi compañera de servicio y casi casi de tesis, la compañera de aventuras de todos y es que conoces de cada uno de nosotros y aun así a todos nos eres fiel. Ale, gracias por apoyarme en esas largas jornadas de trabajo, ojalá que mis explicaciones te hayan ayudado mucho porque tú a mí me ayudaste bastante. Gracias a todos aquellos que me encontré durante los semestres que estuve estudiando y que sin querer se me olvida mencionar, todos

lograron que siempre los recordara con una sonrisa. En general, gracias genticita por los ratos que pasamos.

Muchas gracias a los doctores que me apoyaron y ayudaron en la escuela, en especial a la Dra. Elí a quien conozco desde que entré, la admiro por tenernos tanta paciencia. A la Dra. Eva muchas gracias por ofrecirme la oportunidad de trabajar con usted, la verdad es de lo mejor que pude hacer en la universidad, sé que puedo contar con usted para todo y más que mi asesora ahora es mi amiga. Al Dr. Alejandro mi grandioso tutor, sus interminables pláticas me enseñaron mucho y le agradezco que siempre me escuchó. Al Dr. Pepe Toño que siempre quise que formara parte de mi panel y se me hizo, gracias por las dos analíticas (y los buffers). Al Dr. Luis Guillermo, me gusta platicar con usted y qué bueno que sea mi suegro jaja. Gracias a mis sinodales por tomarse el tiempo de leer toda la tesis, espero que ustedes no sean los únicos.

Por último y obvio no menos importante quiero darle las gracias de nuevo a Dios porque siempre puso en mi camino a las personas indicadas para hacer que todos mis planes salgan bien, para que el tiempo en el que empieza y termina todo siempre sea el correcto, para que lo que suceda sea siempre para aprender y crecer como persona.

¡Gracias!



Esta investigación fue apoyada por el Programa de Estímulos a la Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica del CONACYT, convocatoria 2012, en la modalidad INNOVATEC, Proyecto número 178916, de la Empresa FRITOS TOTIS, S.A. de C.V. Gracias por las facilidades prestadas.



Parte de este trabajo se presentó en la Reunión Anual y Exposición de Alimentos (Annual Meeting and Food Expo) del IFT (Institute of Food Technologists) en Chicago (2013) y también en el 6to Congreso Internacional “CUCCAL IV” Sobre Inocuidad, Calidad y Funcionalidad de los Alimentos en la Industria y Servicios de Alimentación en Cancún, Quintana Roo (2013).

A Adela, Alfredo, Guillermo S., Guillermo...

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Congresos	v
Dedicatoria	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE IMÁGENES	x
RESUMEN	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 MAÍZ	2
1.1.1 Origen	3
1.1.2 Tipos de maíz	5
1.1.3 Estructura y anatomía del maíz	7
1.1.4 Composición química del grano.....	9
1.1.5 Clasificación de las proteínas del maíz.....	11
1.2 NIXTAMALIZACIÓN	14
1.2.1 Calidad de la nixtamalización	15
1.2.2 Cambios químicos durante la nixtamalización	16
1.3 ANÁLISIS TÉRMICO	19
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 GENERAL	23
3.2 ESPECÍFICOS	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1 Condiciones de cocción del maíz	24
4.2 Acondicionamiento de la muestra	24

4.3 Extracción de las fracciones proteicas	25
4.4 Análisis de proteína	26
4.5 Electroforesis	27
4.6 El análisis térmico.....	28
4.7 El análisis estadístico	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1 Extracción de las fracciones proteicas.....	29
5.2 Electroforesis (SDS-PAGE)	30
5.3 El análisis térmico.....	35
6. CONCLUSIONES	41
7. BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporción de las principales estructuras del grano de maíz.	8
Tabla 2. Composición química aproximada de las principales partes de los granos de maíz.....	9
Tabla 3. Distribución de las fracciones de proteína en el maíz blanco dentado	11
Tabla 4. Nomenclatura de las fracciones proteicas y de los residuos	25
Tabla 5. Distribución porcentual de las fracciones proteicas de maíz cocido con y sin cal.....	29
Tabla 6. Temperaturas de pico y entalpías de transición de muestras de harina de maíz y los residuos cocinados con (Ca) y sin calcio (NCa), medidas por DSC (media \pm SD, n=3)	37

ÍNDICE DE IMÁGENES

Figura 1. Espigas del teocintle (A y B), híbridos del teocintle y el maíz (C y C1) e híbrido con su hoja (C2).	3
Figura 2. Maíz palomero (A), Maíz dulce (B), Maíz negro ceroso (C), Maíz dentado blanco (D), Maíz cristalino (E) y Maíz duro (F). Fuente: FAO, 2011.	6
Figura 3. Anatomía del grano de maíz (Colección FAO N°25, 1993)	7
Figura 4. Termograma de gelatinización	20
Figura 5. Electroforesis en condiciones No Reductoras en muestras cocidas con cal (1) y sin cal (2).....	31
Figura 6. Electroforesis en condiciones Reductoras en muestras con cal (3) y sin cal (4)	32
Figura 7. Termograma típico de la gelatinización del almidón (muestras con cal).	36
Figura 8. Termograma típico para muestras control (sin cal)	36

RESUMEN

Se sabe que durante la nixtamalización ocurren cambios químicos que afectan al grano de maíz, especialmente en el gránulo de almidón. El almidón interactúa con los diversos componentes del grano y se cree que principalmente con las proteínas, lo que causa un mayor gasto de energía para conseguir la gelatinización necesaria en la elaboración de productos de botana. En este estudio se determinó el efecto de la extracción secuencial de las fracciones proteicas en las propiedades térmicas de harina de maíz nixtamalizado y se comparó con muestras control (cocción sin cal). La extracción de las proteínas se realizó de acuerdo a la solubilidad de las diferentes fracciones empleando el método de Rojas-Molina *et al.* (2008). El análisis de las propiedades térmicas de los residuos tras la extracción secuencial de proteínas reveló que la ausencia de globulinas en la harina provoca una desestabilización del gránulo de almidón disminuyendo la entalpía de gelatinización (ΔH). Al eliminar globulinas, albúminas y α , β y δ -zeínas (residuo III) se incrementa la entalpía de gelatinización en muestras con cal (4.91 ± 0.14 J/g) contrariamente a lo ocurrido en muestras sin cal (2.73 ± 0.24 J/g). En el residuo que contenía almidón y glutelinas se obtuvo el mayor valor de entalpía (5.97 ± 0.24 J/g) en muestras con cal. La entalpía disminuye notablemente cuando todas las proteínas han sido extraídas a valores próximos a 2.40 J/g. Se concluye que las zeínas desestabilizan al gránulo de almidón, haciendo que cuando están presentes se requiera menor energía para gelatinizarlo. Las globulinas y las glutelinas por el contrario son las fracciones proteicas que contribuyen a dar estabilidad al gránulo de almidón, por lo que su ausencia va a provocar una reducción en la entalpía requerida para la gelatinización del almidón.

Palabras clave: nixtamalización, entalpía de gelatinización, fracción proteica, harina de maíz nixtamalizada.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MAÍZ

El maíz es un producto básico en la alimentación, sociedad, cultura y economía de México. Botánicamente, el maíz pertenece a la familia de las gramíneas, es una planta anual alta dotada de un amplio sistema fibroso (FAO, 2011). Su nombre científico es *Zea mays* cuyo género *Zea* pertenece a la Familia *Poaceae*. En México y Centroamérica existen cinco especies de maíz: *Zea diploperennis*, *Zea perennis*, *Zea luxurians*, *Zea nicaraguensis* y *Zea mays*. La especie *Zea mays* se agrupa en cuatro subespecies:

- *Zea mays* L. ssp. *huehuetenangensis*
- *Zea mays* L. ssp. *mexicana*.
- *Zea mays* L. ssp. *parviglumis*.
- *Zea mays* L. ssp. *mays*, el maíz cultivado propiamente (Kato *et al.*, 2009)

Desde antes del descubrimiento de América (alrededor del año 1000 d.C.) la planta de maíz comenzó a ser esparcida por agricultores-mejoradores siguiendo un proceso de selección en el cual conservaban las semillas de las mejores mazorcas para sembrar en la próxima estación; los indios plantaban maíz en forma simple: echaban las semillas en un agujero, las espolvoreaban con ceniza de madera para mejorar el suelo, añadían un pescado como fertilizante y cubrían las semillas con tierra. Actualmente las variedades de maíz requieren un suelo arcilloso y cálido, además de que el maíz produce más si se siembra después de una cosecha de leguminosas en rotación con otras plantas. El tiempo de desarrollo varía desde dos a siete meses. El clima ideal del maíz es cálido con frecuentes lluvias durante los meses de verano, noches cálidas y humedad alta siendo un producto tropical que no puede darse en regiones frías (FAO, 2011).

1.1.1 Origen

El cultivo del maíz tuvo su origen, con toda probabilidad, en América Central, especialmente en México, de donde se difundió hacia el norte (Canadá) y hacia el sur (Argentina). La evidencia más antigua de la existencia del maíz, de unos 8000 años de antigüedad, fue encontrada por arqueólogos en el valle de Tehuacán (México) pero es posible que hubiese otros centros secundarios de origen en América (Galinat, 1977). Se cree que el maíz actual se desarrolló a partir del teocintle *Zea mays ssp. parviglumis*, (Zhang *et al.*, 2002) cultivo de México y Centroamérica, debido a que comparte muchas características genéticas con el maíz. El teocintle es una planta anual que posee de dos a cuatro hileras de semillas (Figura 1) (Paredes *et al.*, 2009). Se considera que el teocintle tuvo gran influencia en la alta variabilidad genética y desarrollo de las principales razas de maíz en Mesoamérica, como por ejemplo las razas reventón, tepalcintle, tunicado y olotillos.

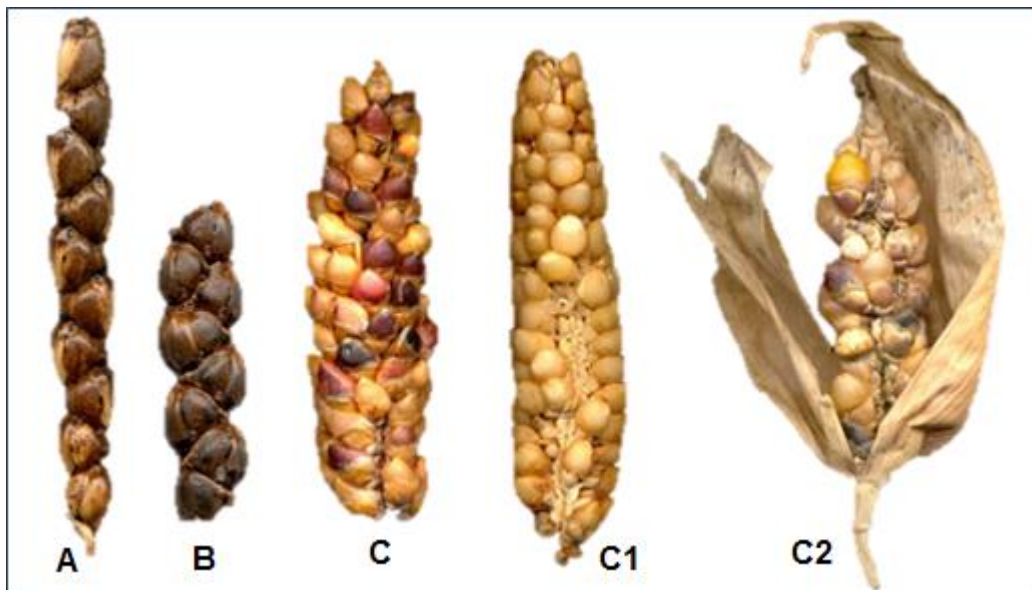


Figura 1. Espigas del teocintle (A y B), híbridos del teocintle y el maíz (C y C1) e híbrido con su hoja (C2).

El maíz era un artículo esencial en las civilizaciones maya y azteca y tuvo un papel importante en sus creencias religiosas, festividades y nutrición. La supervivencia del maíz más antiguo y su difusión se debió a los seres humanos, quienes recogieron las semillas para posteriormente plantarlas o incluso utilizarlas como moneda de cambio por otros productos. A finales del siglo XV, tras el descubrimiento del continente Americano, el grano fue introducido en Europa a través de España. Se difundió entonces por los lugares de clima más cálido del Mediterráneo y posteriormente a Europa septentrional. Ahora, el maíz se cultiva en todas las regiones del mundo aptas para actividades agrícolas y que se recoge todos los meses del año (Galinat, 1977).

Con respecto al teocintle, actualmente se encuentra en peligro de extinción, ya que los agricultores creen que es un tipo de hierba indeseable y lo cortan, dejándolo como abono. Sin embargo distintos estudios han mostrado que por sus genes es compatible con el maíz y se ha tratado de hacer cruza entre las dos plantas, esto con el fin de atribuirle al maíz la resistencia y mayor contenido de nutrientes del teocintle, por lo que en México se han realizado trabajos de monitoreo y recolección del teocintle, siendo el más reciente el proyecto dirigido por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en conjunto con la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Se logró hacer una cruce del maíz con el teocintle el cual se conoce como QPM (por sus siglas en inglés Quality Protein Maize) el cual contiene 55% más triptófano y 30% más de lisina que el maíz normal, además de que el endospermo es duro y vítreo y resiste más a los ataques por insectos (Rojas-Molina *et al.*, 2008). Durante ese trabajo se realizaron visitas a diferentes localidades donde se llevó a cabo el monitoreo de especies de teocintle. Se estudió la distribución geográfica de las poblaciones de la planta de teocintle y se comprobó que no es uniforme en Centroamérica ni en México, además de que existen amenazas puntuales sobre las poblaciones de teocintle, de modo que se requieren proyectos permanentes de monitoreo y programas de conservación *in-situ* con apoyos para la participación de agricultores locales (CONABIO, 2012).

1.1.2 Tipos de maíz

El maíz presenta una gran variabilidad en el color del grano, textura, composición y apariencia. Puede ser clasificado en distintos tipos según: a) la constitución del endospermo y del grano; b) el color del grano; c) el ambiente en que es cultivado; d) la madurez, y e) su uso. Aquí se discutirán los diferentes tipos de maíz basados en la apariencia del grano y del endospermo. De acuerdo a esta clasificación los tipos de maíz más importantes son dentado, cristalino, duro, reventón, harinoso, dulce, ceroso y tunicado (FAO, 2011).

- El maíz dentado (*Zea mays indentata*) posee un endospermo grueso, duro y vítreo, que encierra un centro pequeño, granuloso y amiláceo. Existen dos tipos de endospermo: el endospermo vítreo que es un almidón muy duro y el endospermo harinoso que es relativamente blando. El maíz dentado tiene un endospermo calloso y vítreo a los lados y tanto en la parte posterior del grano como en el núcleo central es blando. Al secarse el sector superior, adquiere una estética similar a la de un diente (Figura 2 D), de ahí su denominación
- El maíz de tipo cristalino (*Zea mays indurata*) se caracteriza por poseer un endospermo de características callosas y vítreas en la parte posterior del grano y a sus lados, sin embargo, el núcleo del mismo es blando (Figura 2 E).
- Los granos del maíz duro son redondos y rígidos al tacto. El endospermo está constituido sobre todo de almidón duro con sólo una pequeña parte de almidón blando en el centro del grano. El maíz duro germina mejor que otros tipos de maíz (Figura 2 F)
- El maíz reventón o palomero (*Zea mays everta*) es un maíz con endospermo duro que ocupa la mayor parte del grano y una pequeña cantidad de almidón blando en la base del mismo; los granos son pequeños, con pericarpio grueso y con forma redonda (Figura 2 A).

- El maíz de tipo harinoso o amiláceo (*Zea mays amylacea*) tiene un endospermo que está compuesto casi exclusivamente de un almidón muy blando, que se raya fácilmente (muy susceptible al daño físico) aun cuando el grano no está maduro. Los tipos de maíces harinosos muestran gran variabilidad en el color de grano y textura.
- Los maíces dulces (*Zea mays saccharata*) se cultivan principalmente para consumir las mazorcas aún verdes, ya sea hervidas o asadas. En el momento de la cosecha el grano tiene cerca de 70% de humedad y no ha comenzado aún el proceso de endurecimiento. Los granos tienen un alto contenido de azúcar y son de sabor dulce (Figura 2 B).
- El maíz ceroso (*Zea mays ceritina* Kulesh) tiene un aspecto opaco y existen muchas variables (Figura 2 C). El almidón en los maíces cerosos está compuesto exclusivamente por amilopectina al contrario de los maíces duros y dentados que están constituidos alrededor del 70% de amilopectina y 30% de amilosa.
- Por último, el maíz tunicado o envainado (*Zea mays tunicata*) es una especie de maíz muy escaso y que no se cultiva comercialmente. Se considera de características primitivas ya que el grano se encuentra encerrado en una vaina (Grobman *et al.*, 1961; Goertz *et al.*, 1978)



Figura 2. Maíz palomero (A), Maíz dulce (B), Maíz negro ceroso (C), Maíz dentado blanco (D), Maíz cristalino (E) y Maíz duro (F). Fuente: FAO, 2011.

1.1.3 Estructura y anatomía del maíz

En botánica el grano de maíz se denomina cariósipside o cariopsis; cada grano contiene cuatro estructuras físicas fundamentales que son el pericarpio, el endospermo, germen o embrión y la piloriza, éste último es un tejido inerte en que se unen el grano y el endocarpio o espiga (Figura 3). Wolf *et al.* (1969) han descrito adecuadamente la anatomía general y la estructura microscópica de estos elementos anatómicos.

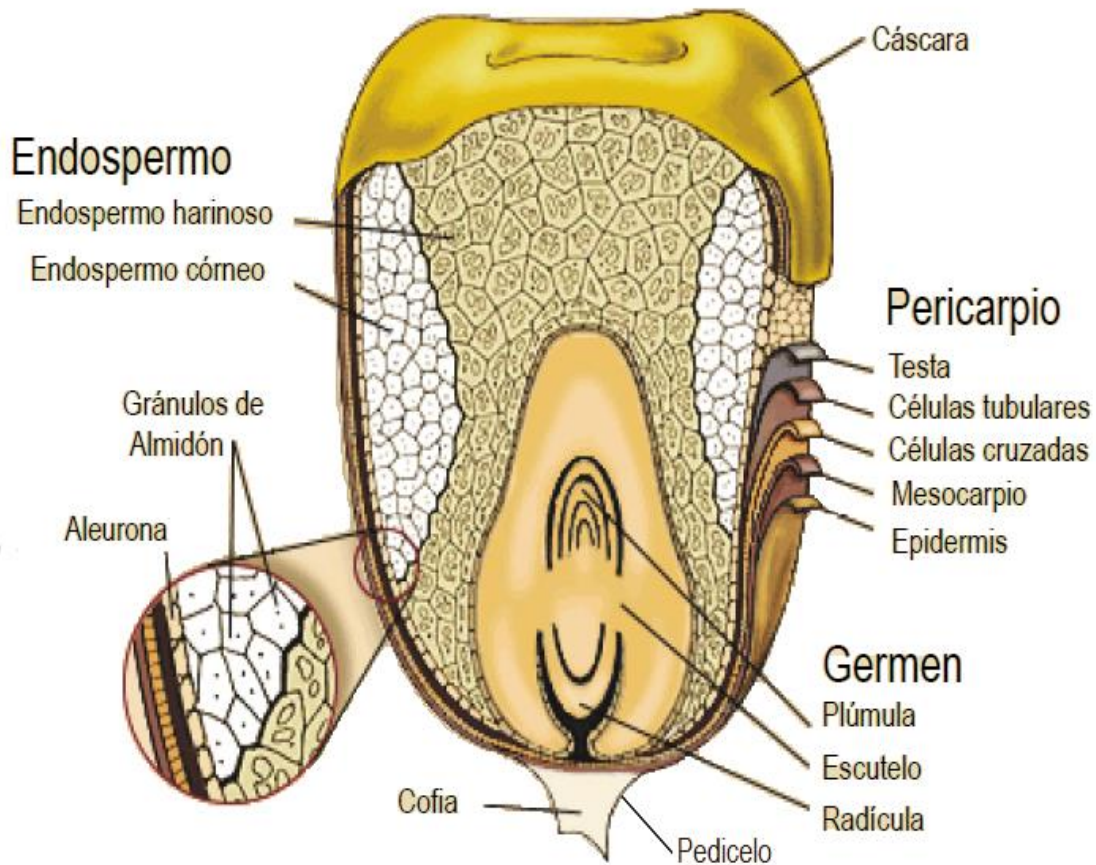


Figura 3. Anatomía del grano de maíz (Colección FAO N°25, 1993)

La distribución de las principales partes del grano se muestra en la tabla 1. El endospermo es la parte de mayor tamaño, corresponde cerca del 83% del peso del grano. Del endospermo se obtienen los nutrientes o fuente de energía antes de que el grano germine. A diferencia del pericarpio, contiene un nivel elevado de almidón (88%), aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de aceite relativamente bajo (Serna, 2009). Por su tamaño, el endospermo aporta la mayor parte de proteínas, seguido por el germen y en último lugar la cubierta seminal, que presenta sólo cantidades reducidas (Bressani y Mertz, 1958).

Tabla 1. Proporción de las principales estructuras del grano de maíz.

Estructura	Porcentaje (%)
Pericarpio	5 – 6 %
Aleurona	2 – 3 %
Endospermo	80 – 85 %
Germen	10 – 12 %

Watson (1987).

El germen se encuentra en el centro del grano de maíz con un 10 - 12 % del peso total. Se caracteriza por un elevado contenido de aceite (33%), contiene también un nivel relativamente elevado de proteínas (cercano al 20%) y minerales que equivale por término medio al 11%.

El pericarpio se caracteriza por un alto contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, que a su vez está formado fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y lignina (0.1%) (Burge y Duensing, 1989).

El resto está constituido por la piloriza o cofia (Figura 3), estructura cónica que junto con el pedicelo une el grano a la espiga (Wolf *et al.*, 1952).

1.1.4 Composición química del grano

La composición proximal del grano de maíz se observa en la tabla 2. Lípidos: el aceite del grano de maíz está fundamentalmente en el germen y viene determinado genéticamente, con valores que van del 3 al 18%. El aceite de maíz tiene un bajo nivel de ácidos grasos saturados: ácido palmítico y esteárico, con valores medios del 11% y el 2%, respectivamente. En cambio, contiene niveles relativamente elevados de ácidos grasos poliinsaturados, fundamentalmente ácido linoleico, con un valor medio del 24% (Serna, 2009). Sólo se han encontrado cantidades pequeñas de ácidos linolénico y araquidónico. Además, el aceite de maíz es relativamente estable, por contener pequeñas cantidades de ácido linolénico (0.7%) y niveles elevados de antioxidantes naturales. El aceite de maíz goza de gran reputación a causa de la distribución de sus ácidos grasos, ácido oleico y ácido linoleico (Bressani *et al.*, 1990).

Tabla 2. Composición química aproximada de las principales partes de los granos de maíz

Componente químico	Pericarpio (%)	Endospermo (%)	Germen (%)	Total del grano (%)
Proteínas	3.7	8	18.4	8-12
Lípidos	1	0.8	33.2	4-18
Fibra Cruda	86.7	2.7	8.8	8-10
Cenizas	0.8	0.3	10.5	1-2
Almidón	7.3	87.6	8.3	72-75

Adaptada de Watson (1987).

En cuanto a carbohidratos, se destaca el almidón, al que corresponde hasta el 72-73% del peso del grano. Se encuentra principalmente en el endospermo y la piloriza (cofia), aunque también en las paredes celulares del endospermo y en menor cantidad en las del germen (Sandstead *et al.*, 1978). Otros carbohidratos son azúcares sencillos en forma de glucosa, sacarosa y fructosa, en cantidades

que varían del 1 al 3% del grano. El almidón está formado por dos polímeros de glucosa: amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal de unidades de glucosa, que constituye hasta el 25-30% del almidón. El polímero amilopectina también consiste de unidades de glucosa, pero en forma ramificada y constituye hasta el 70-75% del almidón (Fenemma, 2000). Esta composición del almidón viene determinada genéticamente, por ejemplo en el maíz más común, (de tipo dentado), el contenido de amilosa y amilopectina es del 25 al 30% y 70 al 75% respectivamente, pero el gen que produce maíz ceroso contiene un almidón formado totalmente por amilopectina, lo que le da una mayor rigidez (Boyer y Shannon, 1987).

Después del almidón y por orden de importancia, las proteínas constituyen el siguiente componente químico del grano de maíz. El contenido de proteína del grano puede cambiar dependiendo del tipo de maíz, la variedad, las condiciones agronómicas y demás factores. Se ha encontrado que el porcentaje de proteína del grano va de 9 al 12%. El contenido de proteína, según Lásztity (1996) es mayor en el germen (17 – 20%) y menor en el salvado (4 – 6%). Por su tamaño, el endospermo contiene cerca del 75% del total de las proteínas del grano y ese contenido va disminuyendo desde la región externa hacia el centro del grano (Hinton, 1953). Las proteínas son moléculas dinámicas e interactivas que sufren numerosos cambios químicos y conformacionales durante la nixtamalización, a pesar de esto no se han estudiado a fondo los cambios que tienen al momento de la nixtamalización, las investigaciones sólo se han enfocado en maíz nativo. Sin embargo se sabe que la zeína polimeriza durante la cocción, presentando una masa molecular mayor a 100 kDa (Doudou *et al.*, 2002). Emmambux y Taylor (2009) estudiaron las propiedades de las prolaminas del maíz tratado térmicamente e informaron que la polimerización de la zeína durante la cocción, es el resultado de la formación de puente disulfuro entre monómeros de zeína.

1.1.5 Clasificación de las proteínas del maíz

La clasificación de las proteínas es muy variada, hay algunos autores que consideran aspectos morfológicos, criterios genéticos, cantidad de aminoácidos esenciales o valor nutricional, función biológica o composición química (White y Jhonson, 2003). Aquí nos basaremos en su clasificación de acuerdo a la solubilidad de cada fracción.

Inicialmente, Osborne en 1924 (Landry *et al.*, 1983), clasificó a las proteínas del maíz en cuatro tipos de acuerdo a su solubilidad: globulinas, albúminas, prolaminas y glutelinas.

*Globulinas

Son las primeras proteínas extraíbles y se les hace referencia como la fracción I. Junto con las albúminas, constituyen la mayoría de las proteínas con actividad fisiológica por la estructura cuaternaria que poseen. Se encuentran concentradas en la capa de aleurona, salvado y germen, con bajo contenido en el endospermo (tabla 3). De acuerdo al procedimiento original de Osborne (1924) se separan de las albúminas mediante una precipitación con sulfato de amonio, aunque en estudios posteriores se encontró que son solubles en soluciones salinas diluidas (Paulis y Wall, 1971).

Tabla 3. Distribución de las fracciones de proteína en el maíz blanco dentado.

Fracción de proteína	Maíz dentado blanco			
	Endospermo (%)	Germen (%)	Pericarpio (%)	Total (%)
Globulinas y albúminas	6	52	30	8.5
Prolaminas (zeínas α , β , δ , γ)	60	5	20	49.3
Glutelinas	26	18	10	37.8
Residuos (proteína no extraíble)	N.R	N.R	N.R	4.3

Adaptada de Ortega *et al.* (1986).

NR: no reportado

*Albúminas

También llamadas fracción II. Las albúminas son proteínas solubles en agua pura (aunque algunas son solubles en sal y se extraen junto con la fracción I) que se encuentran en las células más externas de la capa de aleurona y germen. La mayor parte posee actividad enzimática (amilasas, lipasas, proteasas). Su peso molecular varía desde 12 a 76 kDa. Las albúminas, las globulinas y el nitrógeno no proteico totalizan aproximadamente el 18% del total de nitrógeno, con proporciones del 7%, 5% y 6%, respectivamente (Quintanar, 2009).

*Prolaminas

Son las proteínas de almacenamiento del maíz ubicadas principalmente en el endospermo (constituyen de 44% a 79% de las proteínas del endospermo). Su función es proveer al grano de nitrógeno, carbono y azufre. La zeína es la fracción más importante de este grupo, con más del 45% del contenido total del grano (tabla 3) y representa el 50% de las proteínas asociadas al gránulo de almidón. Las zeínas son prolaminas hidrófobas solubles en alcohol (Lawton, 2002) y se clasifican en α , β , δ (Esen, 1987) y γ (Esen y Stetler, 1992). Anteriormente las α , β y δ -zeínas eran conocidas como la fracción III o G1 de Landry *et al.* (1983) debido a que se consideraban como glutelinas, hoy en día esa nomenclatura ha dejado de usarse. La α -zeína es la prolamina más abundante del maíz con un 70% del total (Thompson y Larkins, 1989). La β -zeína es aproximadamente 5% del total de las zeínas. Las δ -zeínas es el segundo grupo más abundante de prolaminas del maíz, constituyen cerca del 20% y tienen mayor contenido de cisteína. Por último las γ -zeínas son aproximadamente un 5% del total de las zeínas (Thompson y Larkins, 1989). Esta última proteína tiene características intermedias entre zeína y glutelina y en un inicio Landry y Moureaux (1970) la clasificaron como glutelina G2 aunque años más tarde se aceptó como una zeína (y ahora es conocida como fracción IV) (Esen, 1987).

*Glutelinas

El endospermo contiene alrededor de 26% de glutelinas, las cuales están compuestas en su mayoría por ácido glutámico y prolina. Hubo mucha controversia para nombrar a estas proteínas: en un inicio el método más usado para el fraccionamiento de las glutelinas era el LM (Landry y Moureaux, 1970) dando como resultado tres subgrupos de glutelinas, que se nombraron como G1, G2, y G3, a las que le correspondían las fracciones III, IV (anteriormente descritas) y la fracción V. Datos de la literatura muestran que las soluciones descritas por Landry y Moureaux no siempre conducen a un aislamiento bien definido de las fracciones proteicas. Las variaciones parecían ser debido a las leves alteraciones en los experimentos que pueden modificar la eficiencia y selectividad de un medio dado. Por ejemplo, 0.5% de acetato de sodio en medio acuoso con etanol al 55% y 2-mercaptoetanol (2-ME) al 0.6% es suficiente para causar la extracción simultánea de fracciones III y IV, mientras que sin la sal sólo se aísla la fracción III. Además se demostró que algunas fracciones contienen polipéptidos propios de una zeína y las empezaron a clasificar en su mayor parte como zeínas (además de que la nomenclatura de G1, G2 y G3 se ha dejado de usar porque se hacía alusión a las glutelinas). Para despejar un poco la confusión en distinguir las proteínas solubles en alcohol, dos nomenclaturas fueron propuestas: la primera, por Wilson (1985, 1987) y la segunda por Esen (1987) siendo ésta la más usada hoy en día. La nomenclatura de Esen se basa en la solubilidad de la proteína en 2-propanol después de la reducción con 2-ME. Este método emplea una solución diluida de 2-ME y dodecil sulfato de sodio (SDS) para fraccionar a las glutelinas, por lo que queda de la siguiente manera:

- ★ Fracción I: globulinas y albúminas solubles en sal
- ★ Fracción II: albúminas solubles en agua
- ★ Fracción III: α , β , δ -zeínas y proteínas semejantes a zeína (zein-like)
- ★ Fracción IV: γ -zeínas y proteínas semejantes a glutelinas (glutelin-like)
- ★ Fracción V: glutelinas verdaderas (true glutelins)

1.2 NIXTAMALIZACIÓN

Este proceso fue desarrollado por los antiguos pueblos indígenas de América Central, junto con el mejoramiento del cultivo de maíz y su uso en la dieta cotidiana hace más de 4000 años. Tradicionalmente, se conoce como nixtamalización al procedimiento de cocción de los granos de maíz utilizando una solución alcalina, lo cual causa la remoción del pericarpio de los granos de maíz (Bressani, 1958). Suele estar acompañado de una molienda para la realización de la masa, después se hace un prensado de la masa para formar discos que finalmente se cuecen por ambos lados para la realización de las tortillas (Serna *et al.*, 1994).

La nixtamalización es un proceso que comprende principalmente cuatro etapas: a) los granos de maíz son sometidos a cocción en condiciones alcalinas, utilizando normalmente cal (hidróxido de calcio) hasta que el pericarpio se ablande lo suficiente como para ser removido, b) remojar el maíz cocido con la misma solución de cocción (nejayote) durante varias horas (desde 6 hasta 14 h), c) el lavado del maíz y por último, d) la trituración del maíz en molinos hasta convertirla en una aglomeración suave no pegajosa llamada masa. Este proceso ha sido el mismo desde entonces, sin embargo ha sufrido de pequeñas modificaciones para aumentar rendimientos o mejorar la calidad del producto obtenido (Bello *et al.*, 2002).

La cocción en cal tiene varias ventajas: facilita la remoción del pericarpio, controla la actividad microbiana, mejora la difusión y por lo tanto la absorción de agua, aumenta la gelatinización de los gránulos de almidón y mejora el valor nutricional al aumentar el contenido de aminoácidos esenciales (desnaturalización de las proteínas por acción del calor) y el contenido de calcio. El tiempo de remojo distribuye el agua y el calcio a todo el grano, lo cual proporciona el sabor característico de las tortillas. La trituración favorece la digestibilidad del maíz y la cocción del disco por ambos lados le da la textura deseable a las tortillas (Gómez *et al.*, 1992).

1.2.1 Calidad de la nixtamalización

Las industrias del maíz consideran parámetros únicos para el grano nixtamalizado que en gran parte dependen del producto final, algunos de estos incluyen diversas variables de calidad del grano entre las que destacan: el pericarpio retenido en el nixtamal, pérdida de sólidos, dureza del grano después de la cocción y la humedad del nixtamal. En la industria de los productos de maíz hay dos maneras para determinar la calidad del proceso de cocción del grano. Uno de ellos es mediante la evaluación de la textura de los granos de maíz cocidos (nixtamal) y el otro a partir de la medición de su contenido de humedad (Ibarra *et al.*, 2008). La medición de la textura del nixtamal se realiza subjetivamente. Un método común para evaluar la textura consiste en que un trabajador calificado presione los granos cocidos entre las yemas de los dedos o también puede morder en el grano para determinar la resistencia que opone o dureza. La principal desventaja de este método es que requiere personas con mucha experiencia. No es recomendable el uso de texturómetros o de prensas ya que no hay parámetros establecidos para cada especie de maíz ni para productos que se requieran elaborar (Gómez *et al.*, 1992).

Calcular la humedad del nixtamal es importante ya que es uno de los factores implicados en la textura y por lo tanto la calidad de la tortilla. La evaluación del contenido de humedad por gravimetría es un método más tardado pero más exacto y que depende del producto que se quiera comercializar. En el caso específico de las tortillas de maíz la humedad que requiere el grano después de la nixtamalización es de 30 - 35% y después del remojo de 40 - 45% (incluso llegando al 50%) para que la tortilla tenga la calidad deseada en cuanto a textura y rolabilidad. Hay distintas maneras de evaluar la humedad, la más utilizada para granos y harinas es por diferencia de pesos la cual consiste en poner a secar la muestra a 130°C durante 4 horas, dejar enfriar hasta temperatura constante y pesar (Osborne, 1986).

1.2.2 Cambios químicos durante la nixtamalización

La transformación del maíz en tortillas requiere un proceso en el que se utiliza agua, hidróxido de calcio y calor. Estos tres elementos influyen en la composición química del maíz elaborado, dando lugar a modificaciones en su contenido de nutrientes. Los cambios se deben a las pérdidas materiales del grano y a las pérdidas químicas, que pueden derivar de la destrucción de algunos elementos nutritivos y de la transformación química de otros (Quintanar, 2009).

La nixtamalización es necesaria para desarrollar la textura adecuada de la masa y así obtener productos de buena calidad. Sin embargo, además de los cambios físicos, ocurren también cambios a nivel molecular. La cocción con cal debilita las paredes celulares del maíz, facilitando la eliminación del pericarpio; hay difusión del agua y de los iones calcio hacia el endospermo del grano (Laria *et al.*, 2005); se solubiliza la pared celular del endospermo y da lugar a una hinchazón y destrucción parcial de los gránulos de almidón (Cornejo *et al.*, 2013). La gelatinización del almidón es otro aspecto principal al que se someten los granos de maíz durante la nixtamalización. Estos cambios en el almidón han recibido mucha atención debido a que es el principal componente de los granos de maíz (Rojas-Molina *et al.*, 2008). Se ha considerado que los cambios que ocurren en el almidón durante la nixtamalización son los responsables de las propiedades de textura y sensoriales de la masa y de sus productos finales como tortillas, frituras de maíz, chips de maíz, etc. ya que dependiendo del tiempo de cocción se ve modificada la forma de los gránulos. Esto ocurre por la acción del calentamiento: entre mayor sea el tiempo de cocción mayor será el cambio del gránulo de almidón (Campus-Baypoli *et al.*, 1999).

La gelatinización del almidón de maíz ocurre entre los 62 y 70°C, cuando se ha aplicado la suficiente energía para romper los enlaces intermoleculares que se encuentran en el almidón, haciéndolo más susceptible a la degradación enzimática y aumentando su digestibilidad. Así mismo, dificulta la migración de la grasa en los productos fritos y la pérdida de almidón lo que afecta directamente a la textura del producto final (Quintanar *et al.*, 2010).

El segundo compuesto más afectado por la nixtamalización son las proteínas. El tratamiento térmico-alkalino afecta la estructura de las fracciones proteicas aumentando o disminuyendo su estabilidad. Los cambios más importantes se explican a continuación:

- ★ Las albúminas, globulinas y algunas prolaminas disminuyen su solubilidad y se incrementa al mismo tiempo la cantidad de proteína no extraíble (Vivas *et al.*, 1987).
- ★ Las albúminas y algunas globulinas son más susceptibles a solubilizar en el agua de cocción.
- ★ Hay mayor disponibilidad de aminoácidos principalmente lisina y triptófano, debido a la desnaturalización proteica, lo que trae como consecuencia que se incremente la calidad de los productos de maíz.
- ★ Se hallaron niveles de histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y triptófano más elevados en las tortillas que en el maíz. (Bressani y Scrimshaw, 1958).
- ★ Aumento de la relación isoleucina-leucina, aminoácidos ramificados y esenciales.
- ★ La zeína se polimeriza durante la cocción (formación de entrecruzamiento entre monómeros de zeína por puentes disulfuro) lo que resulta en la formación de una estructura más ordenada y que puede presentar una masa molecular mayor a 100 kDa (Doudu *et al.*, 2002).
- ★ El agua juega un papel muy importante en la movilidad de la zeína, facilitando su interacción con otros péptidos lo que promueve el entrecruzamiento de enlaces disulfuro, estas interacciones facilitan la formación de redes que hacen más rígida la estructura de los geles de almidón (Makeda y Kokini, 1992).
- ★ La presencia de cal parece promover uniones entre calcio y zeína y entre calcio, zeína y almidón, principalmente por puentes de calcio que son difíciles de romper, por lo que se cree incrementa la termorresistencia de las proteínas (Quintanar, 2009).

- ★ La cocción hincha las capas del pericarpio (se hace más frágil) lo que provoca su desprendimiento.
- ★ La capa de aleurona impide la lixiviación de nutrientes al nejayote.
- ★ Disponibilidad de niacina: Se rompe la ligadura de la niacina a la estructura del grano liberándose como ácido nicotínico.
- ★ La cal permite la absorción rápida del agua y hace que mejore su difusión hacia el centro del grano, ocasionando que la gelatinización sea homogénea.
- ★ Además, la cal actúa como agente activo y forma enlaces químicos tipo cross-linking entre las cadenas poliméricas de almidón por medio de iones de calcio, lo cual hace que el almidón de las harinas cambie sus propiedades (Quintanar, 2009).
- ★ Durante la nixtamalización el almidón alcanza un bajo grado de gelatinización; en el tiempo de remojo se retrograda (se vuelve a asociar) y forma nuevas estructuras (Doudou *et al.*, 2002).

Muchos de estos cambios tienen una marcada influencia en las propiedades de los productos finales como la cohesividad, rolabilidad, elasticidad, olor, color, sabor, propiedades térmicas, etc.

En cuanto a efectos negativos se refiere, parte de las vitaminas hidrosolubles se pierden alcanzando valores de hasta el 70%. También se pierde la mayor parte de la fibra dietética localizada en el pericarpio, así como la tiamina, riboflavina y carotenoides (Bressani, 1990).

1.3 ANÁLISIS TÉRMICO

Cuando una muestra es sometida al calor puede sufrir de cambios físicos y químicos, que alteran su composición de diversas formas y pueden llevarla a un estado completamente estable. Esto establece el comportamiento de las muestras en función de la temperatura. Sin embargo, una simple observación no es suficiente para cuantificar los cambios que tienen lugar y se requieren medidas adicionales de dichos cambios. El uso de aparatos sencillos puede permitir determinar de forma precisa, por ejemplo, la temperatura a la cual tiene lugar una variación física o química (como la gelatinización). Esta variación, específicamente en una propiedad física de la muestra, es la pauta para un análisis térmico (Gómez, 2009).

El método de la calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés), es utilizado para cuantificar los cambios en algunos polímeros al ser afectados por la temperatura. Esta técnica permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante durante un tiempo determinado, o cuando es calentada o enfriada a velocidad constante en un determinado intervalo de temperaturas. La técnica DSC es importante en el campo de los alimentos, específicamente en los polímeros, debido a su grado de sensibilidad y a su rápida velocidad de análisis. El conocimiento de la estabilidad térmica de un material, así como la completa caracterización de sus transiciones, son de interés en las materias primas dirigidas a aplicaciones en la industria, por lo que el calorímetro diferencial de barrido es de gran ayuda (Suriñach *et al.*, 1992).

El calorímetro diferencial de barrido dispone de dos cápsulas. Una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra está generalmente vacía o se puede poner una muestra conocida y es llamada la de referencia. Se usan calefactores individuales para cada cápsula y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia. Si se detecta cualquier diferencia, los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas cápsulas. Es decir, cuando tiene lugar

un proceso exotérmico o endotérmico, el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas cápsulas.

Como regla general puede decirse que todas las transformaciones o reacciones donde se produce un cambio de energía, puede medirse por DSC y graficarse (Figura 4).

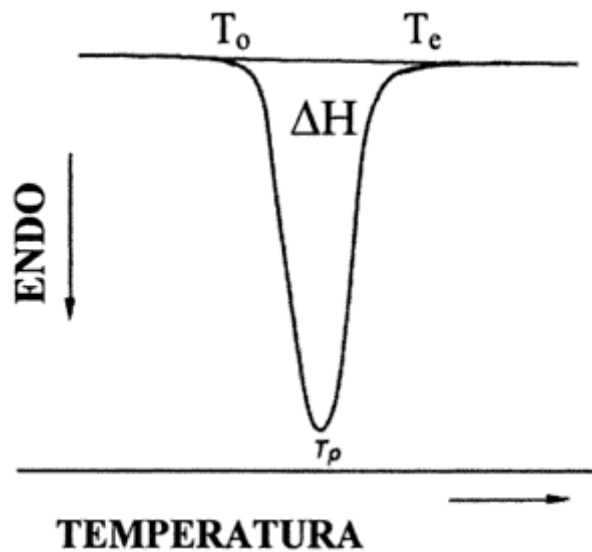


Figura 4. Termograma de gelatinización

Entre las diversas utilidades de la técnica podemos destacar:

- ★ Medida de la capacidad calorífica aparente
- ★ Determinación de temperaturas características de transformación o de transición tales como: transición vítrea, cristalización, transformaciones polimórficas, fusión, ebullición, sublimación, descomposición, isomerización, etc.
- ★ Estabilidad térmica de los materiales
- ★ Cinética de cristalización de los materiales (Suriñach *et al.*, 1992).

Al graficar un termograma, realmente se está viendo la diferencia de temperaturas que necesita aplicar el calefactor para que ambas muestras calienten a la misma temperatura. Normalmente se grafica esa diferencia de temperaturas (ΔT) contra el tiempo (minutos). Los datos obtenidos de las transiciones que se registraron en un endoterma (pico) relacionan el flujo calórico como una función de la temperatura cuando se lleva a cabo la gelatinización del almidón, es en ese momento cuando el equipo tiene que suministrar más calor a la referencia para equilibrar al sistema. El pico endotérmico se relaciona con la temperatura promedio a la cual se lleva a cabo la gelatinización.

De la información que proporciona el DSC hay cuatro datos importantes que se ven en los resultados del termograma: T_o , T_p , T_e y ΔH . T_o se define como la temperatura de inicio de la transición, en la gelatinización normalmente se encuentra entre 62 a 84°C (Quintanar 2010). El pico endotérmico se relaciona con la temperatura promedio a la cual se lleva a cabo la gelatinización, este parámetro se conoce también como temperatura de pico o T_p . T_e es la temperatura en la que la transición ha terminado o temperatura final. El área dentro de la curva es la medida de la entalpía de transición (ΔH), es decir, el calor necesario para llevar a cabo la gelatinización (en este caso, del almidón). Estos resultados proporcionan información acerca del orden-desorden de las moléculas dentro del sistema (Evans y Haisman, 1982).

2. JUSTIFICACIÓN

Específicamente, la calidad de las proteínas del maíz se ha estudiado desde hace más de 50 años y se sigue haciendo con el propósito de mejorar el maíz para que contenga proteínas con mayor contenido de aminoácidos y así incrementar su valor nutricional. Sin embargo aún no hay muchos estudios acerca de los cambios que tienen las proteínas durante la nixtamalización y como afectan a la gelatinización del almidón. Se tiene un conocimiento limitado aproximado de las modificaciones en la calidad de la proteína del maíz nixtamalizado y de su relación con el calcio. Así mismo, no se han reportado estudios relacionados con las transformaciones morfológicas de las proteínas en las transiciones de fase de la gelatinización del almidón en el grano de maíz nixtamalizado. Los cambios químicos en el procesamiento del maíz por nixtamalización sugieren que las proteínas son el componente más afectado después del almidón debido a su capacidad de captar energía térmica. El resultado de estas uniones e interacciones se ve reflejado en las propiedades térmicas de las harinas de maíz nixtamalizado. Se sabe que con el calor las proteínas polimerizan principalmente a través de puentes disulfuro y otras interacciones pero se desconoce si el calcio tiene un papel activo en dicha polimerización.

Por ello el objetivo principal de este trabajo es estudiar el efecto de la extracción secuencial de las diferentes fracciones proteicas del maíz nixtamalizado frente a maíz cocido sin cal, en las propiedades térmicas de la masa resultante.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Determinar el efecto de la extracción secuencial de las fracciones proteicas en las propiedades térmicas de la harina de maíz nixtamalizado por medio de estudios calorimétricos.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Extraer secuencialmente las fracciones proteicas de la harina de maíz nixtamalizado y evaluar dichas fracciones mediante electroforesis SDS-PAGE.
- ✓ Evaluar las propiedades térmicas (T_p y ΔH) de los residuos de harina obtenidos tras la extracción secuencial de cada una de las fracciones proteicas mediante calorimetría diferencial de barrido.
- ✓ Comparar los resultados frente a los obtenidos con la muestra control cocida sin cal.

4. METODOLOGÍA

Se utilizó la variedad de maíz dentado blanco (*Zea mays indentata*), obtenido en la región de El Arenal, Hidalgo. Se realizó una selección de los granos (eliminando impurezas, insectos, granos rotos, pequeños, reseco, etc.). El tratamiento alcalino se llevó a cabo con cal comercial (hidróxido de calcio; pureza 82%) utilizada comúnmente en la industria de la tortilla. El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

4.1 Condiciones de cocción del maíz

Se nixtamalizaron lotes de 500 g de maíz en 1.5 L de agua, usando 1% (p / p) de hidróxido de calcio (cal) / peso de maíz. Las muestras con nombre "Ca" se sometieron a un tratamiento térmico a 90°C durante 20 min hasta alcanzar humedad del 36%, mientras que lotes control de 500 g (no nixtamalizada llamada "NCa") se cocieron en 1.5 L durante 43 minutos en ausencia de cal para llegar a la misma humedad (Gutiérrez *et al.*, 2007).

4.2 Acondicionamiento de la muestra

Tras la cocción se dejó en reposo durante 14 h para alcanzar una humedad alrededor de 42%, a continuación las muestras se lavaron con agua desionizada hasta que el pH de las aguas de lavado fue de 7.0. Tras el lavado, el maíz se molió en un procesador de alimentos (Oster, China) obteniendo el nixtamal el cual se dejó secar una noche a 40°C. Posteriormente la muestra se molió y tamizó a través de un tamiz número 100 (150 µm).

Las muestras se desengrasaron con hexano. Para ello, a muestras de 100 g de harina se adicionaron 900 mL de hexano con agitación constante durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugaron a 12000 g (15700 rpm) durante 5 min para recuperar la harina desengrasada. La extracción de grasa se realizó por triplicado para cada una de las harinas (Ca y NCa). Las muestras se secaron durante toda la noche a 40°C con el fin de evaporar el hexano residual.

4.3 Extracción de las fracciones proteicas

Las fracciones proteicas se extrajeron a partir de la harina del maíz nixtamalizado (Ca) y de la harina del maíz no tratada con cal (NCa) (50 g por triplicado) según la metodología descrita por Rojas-Molina *et al.* (2008). En la tabla 4 se indica la nomenclatura para cada una de las fracciones extraídas.

Tabla 4. Nomenclatura de las fracciones proteicas y de los residuos

		Harina			
		Con Ca	Sin Ca		
		CaR	NCaR		
SOBRENADANTE			PRECIPITADO		
Fracciones proteicas		Proteínas extraídas		Composición	
Con Ca	Sin Ca	Residuos			
CaF1	NCaF1	Globulinas y albúminas solubles en sal		CaR1	NCaR1
CaF2	NCaF2	Albúminas solubles en agua		CaR2	NCaR2
CaF3	NCaF3	α -, β -, δ - zeínas y proteínas tipo zeína		CaR3	NCaR3
CaF4	NCaF4	γ - zeínas y proteínas tipo glutelina		CaR4	NCaR4
CaF5	NCaF5	Glutelinas verdaderas		CaR5	NCaR5

Las soluciones de extracción fueron las siguientes:

- 1) Una solución de NaCl 0.5 M a 4°C para la extracción de globulinas y albúminas solubles en sal (CaF1 y NCaF1).
- 2) Agua desionizada a 4°C para la extracción de albúminas solubles en agua (CaF2 y NCaF2).
- 3) 55% (p / p) 2-propanol + 0.6% (v / v) de 2-ME a temperatura ambiente para la extracción de α -, β -, δ -zeínas y las proteínas tipo zeína (CaF3 y NCaF3).

- 4) 0.5 M de NaCl con buffer de boratos a pH 10 + 0.6% (v / v) 2-ME a temperatura ambiente para la extracción de γ -zeínas y proteínas tipo glutelina (CaF4 y NCaF4).
- 5) 0.5% (p / v) de dodecilsulfato de sodio (SDS) con buffer de boratos a pH 10 + 0.6% (v / v) 2-ME a temperatura ambiente para la extracción de glutelinas verdaderas (CaF5 y NCaF5).

Posteriormente, las fracciones de proteína que fueron extraídas se dializaron en un tubo de membrana porosa Spectra/pore (Spectrum Medical Industries, Inc., Canadá) con un tamaño de poro de 3500 Da utilizando como solución de concentración menor agua desionizada. Esto se realizó hasta que la conductividad se mantuvo constante. A continuación, los extractos dializados se ultracongelaron a -80°C y se liofilizaron para obtener los aislados de proteína.

Tras la extracción de cada fracción proteica se retiraron aproximadamente 8 g de cada muestra y se secaron por una noche a 40°C (residuos). Para el análisis térmico se obtuvieron cinco residuos: CaR1 y NCaR1 (después de la extracción de globulinas y albúminas solubles en solución salina), CaR2 y NCaR2 (residuo anterior después de la extracción de albúminas solubles en agua), CaR3 y NCaR3 (residuo anterior después de la extracción de α -, β -, δ -zeínas y proteínas tipo zeína), CaR4 y NCaR4 (residuo anterior después de la extracción de γ -zeínas y proteínas tipo glutelina) y CaR5 y NCaR5 (residuo después de la extracción de proteínas extraíbles). En la tabla 4 se indica la nomenclatura para cada residuo.

4.4 Análisis de proteína

El porcentaje de proteína cruda ($N \times 6.25$) de todas las fracciones proteicas, Ca, NCa, CaR5 y NCaR5 se determinó por el método de Dumas con un sistema autoanalizador FP-528 (LECO, Corporation, St Joseph, USA). Se pesó 0.1 g de muestra homogenizada sobre un papel de estaño (tin foil) y se colocó dentro del horno de combustión. Todas las muestras se midieron por triplicado.

4.5 Electroforesis

La composición de las fracciones proteicas se analizaron mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras (calor y 4% de 2-ME) y no reductoras (omitiendo el calor y la presencia de 2-ME). La electroforesis se realizó en un sistema de gel vertical de Mini-Protean 3 (minigel, TBIO Corporación-Rad, Hércules, CA) utilizando un gel de separación de 15% de acrilamida y con un gel de concentración de 4%. A las muestras con un contenido aproximado de 0.20 mg de las fracciones de proteínas liofilizadas de las harinas de maíz nixtamalizado y el control se adicionaron 0.3 ml de tampón (0.01% azul de bromofenol, 10% de glicerol, Tris HCl 0.625 M, SDS al 10%) para obtener una concentración final de 10 mg de proteína / mL.

En condiciones reductoras se adicionó 4% de 2-ME y las muestras se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugaron (centrífuga Eppendorf modelo 5415 D, Hamburgo, Alemania) a 12000 g (15700 rpm) a temperatura ambiente durante 15 min.

Para las condiciones tanto reductoras como no reductoras, 20 μ L de sobrenadante se cargaron en pocillos de muestra junto con 5 μ L de marcador de peso molecular con estándares desde 10 a 250 kDa (BioRad, Richmond, CA). Se realizó la electroforesis a 200 V durante aproximadamente 30 min. Los geles se trataron con una solución de tinción de Azul Brillante de Coomassie R-250 (BioRad, Richmond, CA) y después se destiñeron con una solución de metanol y ácido acético glacial (4:1). Todas las pruebas de gel se realizaron por triplicado. Las masas moleculares de las proteínas se estimaron a partir de la trama de registro de la movilidad relativa frente al peso molecular de los patrones de proteína.

4.6 El análisis térmico

Los picos de temperatura de transición (T_p) y las entalpías (ΔH) de todas las muestras (CaR y NCaR) se determinaron utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Mettler Toledo (Modelo 822E). El DSC se calibró con indio ($T_o = 156.4^\circ\text{C}$, $\Delta H = 28.4 \text{ J/g}$) y los datos fueron analizados utilizando el software Pyris. Aproximadamente 10 g de muestra seca se mezcló con agua desionizada para obtener una mezcla de contenido de humedad del 50%, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 h para asegurar que la hidratación se llevó a cabo (Cameron y Wang, 2006). Se determinó un contenido de humedad del 50% para el análisis térmico de acuerdo con Sahai (2001), que indican que el nixtamal y la masa tienen contenidos de humedad de 46-51%. Muestras de alrededor de 8 mg fueron pesadas en charolas de aluminio de 40 μL (Mettler Toledo, ME-27331). Las charolas se sellaron herméticamente y se sometieron a una rampa de temperatura desde 25°C hasta 120°C a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$ utilizando como referencia una charola vacía. Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado.

4.7 El análisis estadístico

Se utilizó el software Statgraphics (Minitab Inc., State College PA) para analizar los datos mediante la aplicación de un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% ($p = 0.05$) y las diferencias significativas entre las medias fueron definidas por el uso de la prueba de Student-Newman-Keul (Steel y Torrie, 1980).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Extracción de las fracciones proteicas

Los resultados de la distribución de las fracciones proteicas y los porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 5. La muestra NCaF presentó un menor contenido de proteína que la muestra CaF, probablemente porque los tiempos de cocción no fueron los mismos para ambas muestras. La cocción de NCaF (43 min) fue el doble de tiempo que la de CaF (20 min), lo que pudo haber favorecido una mayor pérdida de proteína por solubilización en el agua de cocción.

Tabla 5. Distribución porcentual de las fracciones proteicas de maíz cocido con y sin cal

Muestra	Proteína total (%)	Porcentaje de proteína total extraída ²					Residuo	Proteína recuperada (%)
		F1	F2	F3	F4	F5		
Ca	7.40 ^a (0.12)	7.06 ^b (0.07)	0.48 ^b (0.03)	43.11 ^b (0.43)	3.54 ^b (0.21)	32.40 ^b (0.72)	8.04 ^a (0.86)	94.63
NCa	7.21 ^a (0.06)	6.13 ^a (0.13)	0.27 ^a (0.01)	40.90 ^a (0.57)	2.36 ^a (0.03)	29.39 ^a (0.28)	7.16 ^a (0.13)	86.20

¹Media (desviación estándar) de tres mediciones

²F1: globulinas y albúminas solubles en sal, F2: albúminas, F3: α -, β -, δ -zeínas y proteínas tipo zeínas, F4: γ -zeínas y proteínas tipo glutelinas y F5: glutelinas.

^{a, b}: Media en la misma columna con diferente letra tienen diferencia significativa ($P < 0.05$).

El contenido de proteína total fue similar al rango de 7.28% - 7.51% reportado por Bressani *et al.* (2001) y Rojas-Molina *et al.* (2008). Sin embargo fue más bajo que el valor promedio ($9.72\% \pm 0.54$) encontrado por Flores *et al.* (2000) en las harinas comerciales de maíz nixtamalizado. Esto puede ser por las distintas especies de maíz que se utilizaron en cada trabajo. Los porcentajes de proteína recuperada a partir de las fracciones CaF1, CaF2 y CaF3, fueron cercanos a lo reportado por Vivas *et al.* (1987) con valores de 8.2% para las globulinas y albúminas y de 50.5% para las prolaminas y proteínas tipo zeínas reportadas por Vivas *et al.*

(1987). De acuerdo a Ortega *et al.* (1986), Vivas *et al.* (1987) y Rojas-Molina *et al.* (2008) usualmente se encuentran concentraciones menores de globulinas y albúminas después de la cocción y el reposo. El mismo comportamiento fue encontrado en las proteínas solubles en alcohol (α , β , δ -zeínas y proteínas tipo zeína), mientras que las glutelinas mostraron un comportamiento opuesto a lo anterior: su concentración incrementó probablemente como consecuencia de la formación de nuevos enlaces covalentes a través de puentes disulfuro, junto con interacciones no covalentes (como enlaces iónicos, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas) y procesos de desnaturalización. Este fenómeno de polimerización también se ha observado cuando el maíz se cuece en ausencia de cal (Mohiedeen *et al.*, 2010) o se seca con aire caliente (Malumba *et al.*, 2008).

Finalmente se observó menos cantidad de proteína en el residuo final en comparación con el contenido de proteína reportado por Vivas *et al.* (1987) de 15%. Esto se atribuye a que en este caso se extrajeron las proteínas en diferentes condiciones que lo reportado por estos autores.

5.2 Electroforesis (SDS-PAGE)

Los patrones y los resultados de SDS-PAGE en condiciones no reductoras de la proteína extraída a partir de muestras tratadas con cal y sin cal se muestran en la Figura 5. Las fracciones CaF1 y NCaF1 (F1 en todos los geles), correspondientes a las globulinas y albúminas solubles en solución salina, mostraron una menor intensidad en el patrón de bandas en comparación con el patrón del maíz crudo que estudió Wall *et al.* (1988). El comportamiento de este patrón es similar al patrón de proteínas totales solubles en sal extraídas del maíz que se seca a 80°C, según Malumba *et al.* (2008). Las fracciones CaF2 y NCaF2 (correspondiente a las albúminas, línea F2 en los geles) están casi ausentes después de la etapa de la nixtamalización, tanto en condiciones reductoras como en condiciones no reductoras.

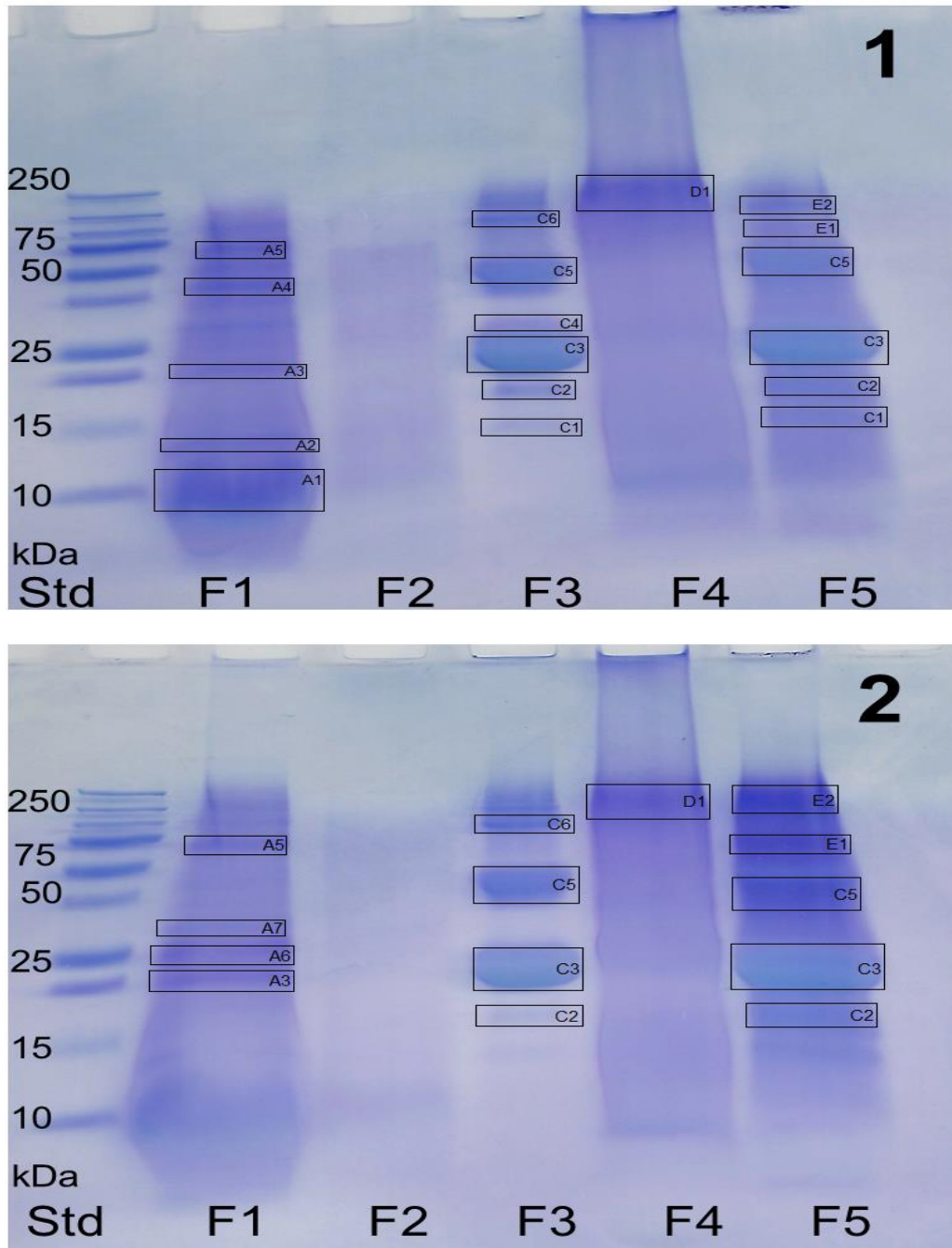


Figura 5. Electroforesis en condiciones No Reductoras en muestras cocidas con cal (1) y sin cal (2).

A1-A5: Globulinas con peso molecular de 12-89 kDa
 C1-C6: α -, β -, δ -zeínas con peso molecular de 15-150 kDa
 D1: γ -zeínas con peso molecular de 150-200 kDa
 E1-E2: glutelinas con alto peso molecular >200 kDa

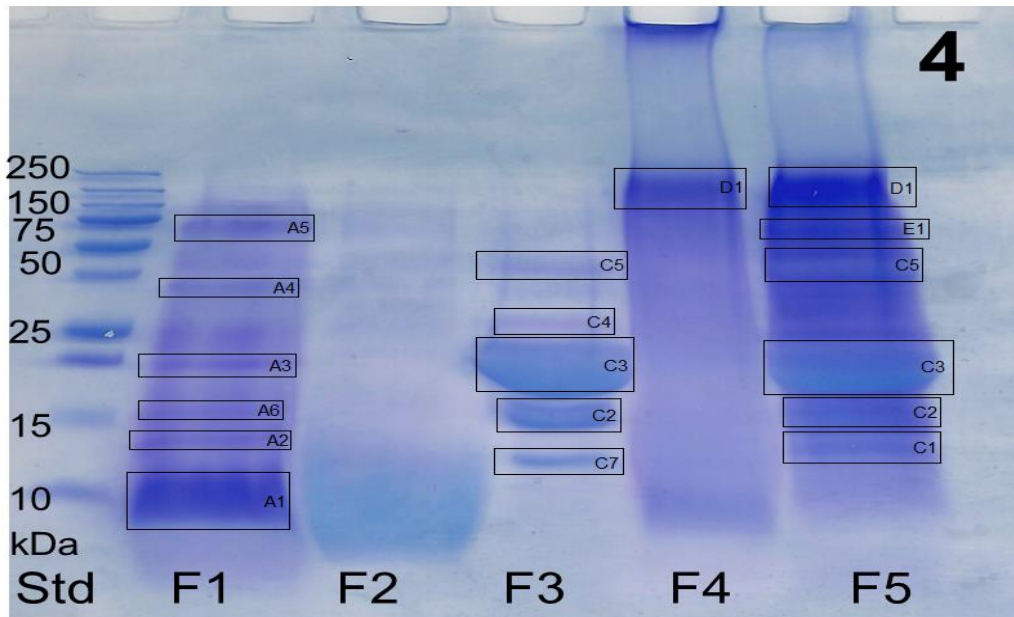
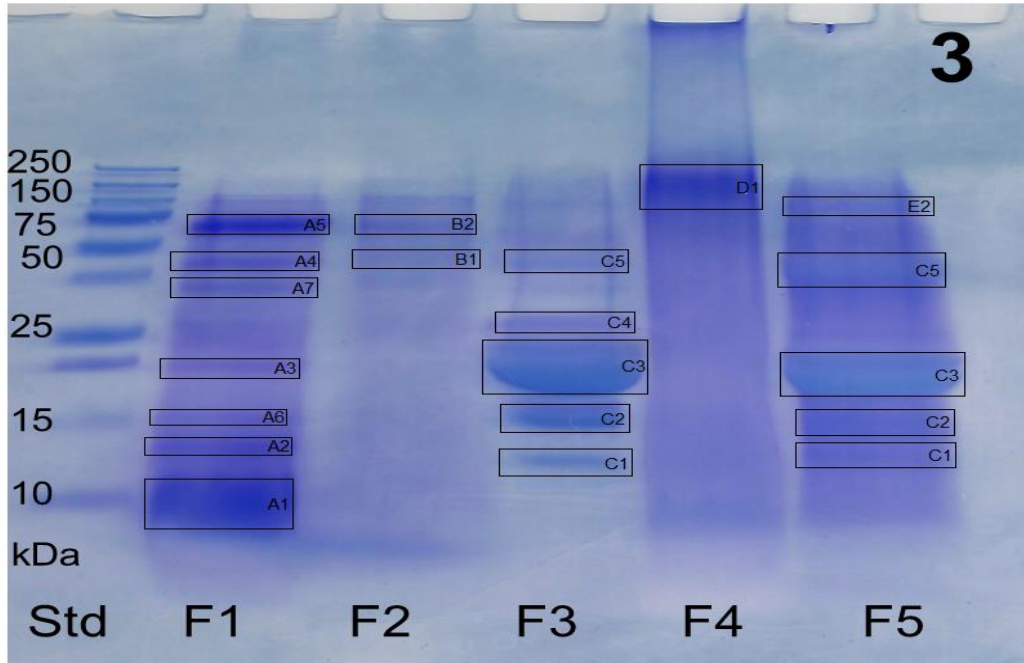


Figura 6. Electroforesis en condiciones Reductoras en muestras con cal (3) y sin cal (4)

A1-A5: Globulinas con peso molecular de 12-89 kDa
 B1-B2: Albúminas con peso molecular de 50-75 kDa
 C1-C7: α -, β -, δ -zeínas con peso molecular de 15-150 kDa
 D1: γ -zeínas con peso molecular de 150-200 kDa
 E1-E2: glutelinas con alto peso molecular >200 kDa

Las bandas de CaF2 (que tuvo un tiempo de cocción menor) eran perceptibles después de someterlas en condiciones reductoras (Figura 6, B1 y B2), que podría corresponder a la fracción de proteínas solubles en sal que no se retiró anteriormente, y que se mantuvo agregada, lo que impide su remoción después del tratamiento.

Las proteínas de las fracciones CaF3 y NCaF3, es decir α , β , δ - zeínas y las proteínas tipo zeína fueron la fracción más abundante (43.11 % \pm 0.43 y 40.90 % \pm 0.57 respectivamente). Esta clase de proteínas encapsula al almidón en una matriz de almidón-proteína hidrófoba (Hoffman *et al.*, 2011) que se ha definido como una barrera fisicoquímica a la accesibilidad y la digestión de almidón (Owens *et al.*, 1986; Singh *et al.*, 2003).

Las fracciones CaF3, NCaF3, CaF5 y NCaF5 presentaron valores similares de solubilización de proteínas a los reportados por Ortega *et al.* (1986) (41.6% para la zeínas y tipo zeínas y el 31.2% para las glutelinas) y Rojas- Molina *et al.* (2008) (más de 35% y 30%, respectivamente). Los autores sugirieron que las fracciones de zeínas y las proteínas tipo glutelinas presentan valores más bajos en la harina que en el maíz crudo debido a que estas proteínas pueden haber interactuado con otros polipéptidos insolubles, y se solubilizan únicamente después del tratamiento con SDS. Lo anterior se observó en este estudio, donde el patrón de electroforesis de CaF5 y NCaF5 mostró bandas que aparecen también en la fracción III (figura 5: C2, C3 y C5), lo que indica que algunas prolaminas no se podían solubilizar hasta que fueron tratadas con SDS.

Los patrones de electroforesis de las fracciones CaF3 y NCaF3 (línea F3 en todos los geles) fueron similares, independientemente de la presencia o ausencia de cal en el proceso de cocción. Bajo condiciones reductoras, se observó el patrón típico de bandas para prolaminas en la región de bajo peso molecular, también se vio la presencia de las bandas de los monómeros de α -zeína (19 y 22 kDa), la banda de β -zeína (14 kDa), la banda δ -zeína (10 kDa) y las bandas de γ -zeína (16 y 27 kDa)

(Shewry y Halford, 2002). También se observaron bandas de los dímeros de α -zeína (38-44 kDa) según lo informado por Emmambux y Taylor (2009).

Se observó un desplazamiento de las bandas de proteínas hacia la región superior de la placa de gel cuando las muestras se corrieron en condiciones no reductoras. En este caso, la presencia de dímeros (40 - 45 kDa) y trímeros (~ 65 kDa) de zeína fue más notable. Además, las bandas correspondientes a γ -zeína estaban ausentes y las bandas de β - y δ -zeínas no se ven claramente, especialmente en las muestras de NCaF. La γ , β y δ zeína tienen un número más alto de residuos cisteína (Nonthanum *et al.*, 2012), que podrían favorecer la reticulación mediante enlaces disulfuro, que impiden la visualización de las bandas características en condiciones no reductoras.

De acuerdo con la tabla 4, los porcentajes de proteína extraída en CaF4 y NCaF4 son pequeñas en comparación con Ortega *et al.* (1986) y Rojas-Molina *et al.* (2008) de más de 10% para ambos estudios. Malumba *et al.* (2008) también reportaron un pequeño porcentaje de la fracción 4 que atribuyen al uso de acetato de sodio en la extracción de zeína como fracción glutelina. Sin embargo no se utilizó acetato de sodio en este estudio. La glutelina G2, con una composición de aminoácidos similares a las proteínas solubles en sal (Landry *et al.*, 1983) podría haber desarrollado otro tipo de interacciones, aparte de enlaces disulfuro. Estas interacciones pudieron haber sido interrumpidas después de que se realizara el tratamiento con SDS, así que puede que las proteínas hayan sido extraídas con la fracción 5.

La electroforesis SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras de la fracción 4 (F4 en todos los geles), muestra una banda disminuida para los agregados de proteína de alto peso molecular que no se solubilizaron por el 2-ME. La electroforesis en condiciones reductoras reveló de nuevo la misma banda de proteína de alto peso molecular (>200 kDa) lo que indica que se formaron agregados de alto peso molecular durante la nixtamalización y eran incapaces de

penetrar en los poros del gel de separación sin tomar en cuenta el tratamiento de cocción (con o sin cal).

En el caso de la fracción 5 (F5 en todos los geles) las bandas se ven difusas y mal resueltas. La presencia de la proteína que no migra en el gel en las muestras de NCa reveló la polimerización intensiva en la fracción de glutelina, especialmente en muestras no tratadas con cal que fueron sometidas a un tiempo mayor de cocción (bandas E2). Estos datos confirman la disociación incompleta de los agregados en monómeros/dímeros de las muestras y la existencia de otros tipos de enlaces aparte de enlaces disulfuro. La presencia de la banda de 60 kDa en muestras de NCa (E1), podría corresponder a las proteínas solubles en sal, que se desnaturalizaron y formaron enlaces disulfuro, incorporándose así en la fracción de glutelina (Wall *et al.*, 1988).

5.3 El análisis térmico

En general, el tiempo de cocción se determina por el contenido de agua, hasta que los granos de maíz cocidos alcanzan de 30 a 50% de humedad. En este trabajo, los granos de maíz cocidos con cal y sin cal fueron cocinados hasta que ambos llegaron a 35% de humedad. En estas condiciones, la textura del nixtamal se consideró adecuada para la fabricación de la tortilla (la evaluación se realizó subjetivamente).

En la figura 7 se muestra un termograma típico de la gelatinización en muestras cocidas con cal y en la figura 8 se observa el termograma para las muestras control (sin cal). En ambas figuras se puede apreciar la temperatura de inicio de la transición, la temperatura pico, la entalpía de gelatinización del almidón y la temperatura final de la transición. Las propiedades que se utilizaron para la evaluación fueron T_p y ΔH .

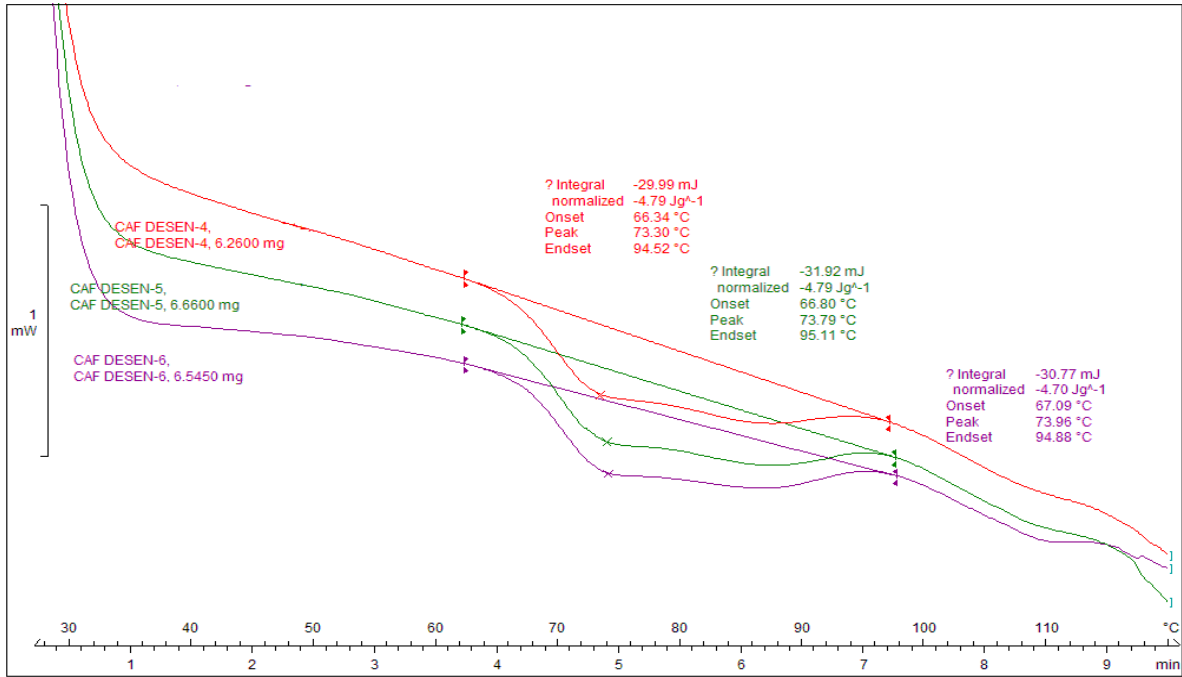


Figura 7. Termograma obtenido para muestras CaR.

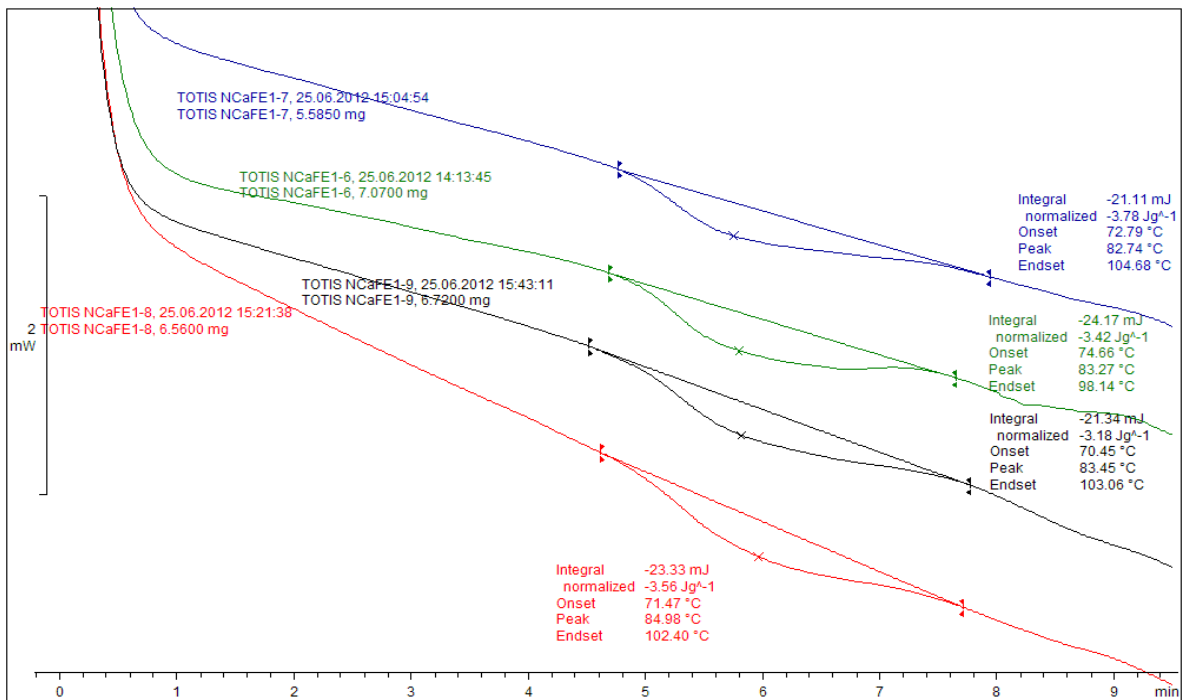


Figura 8. Termograma de muestras NCaR

La temperatura pico y entalpía de gelatinización de todas las muestras se resumen en la tabla 6, en donde se observa que las muestras control mostraron valores más altos en T_p que los de las muestras tratadas con cal. Este comportamiento podría explicarse porque la cocción se prolongó hasta que los granos alcanzaron el 35% de humedad. Como se mencionó anteriormente, las muestras cocidas con cal requirieron de 20 minutos, mientras que en las muestras control fue de 43 minutos para llegar al 35% de humedad.

Tabla 6. Temperaturas de pico y entalpías de transición de muestras de harina de maíz y los residuos cocinados con (Ca) y sin calcio (NCa), medidas por DSC (media \pm SD, n=3)

	T_p ($^{\circ}$ C)		ΔH (J/g)	
	Con cal (Ca)	Sin cal (NCa)	Con cal (Ca)	Sin cal (NCa)
Control*	73.80 \pm 0.11 ^{a, I}	78.17 \pm 1.88 ^{a, II}	4.80 \pm 0.01 ^{c, II}	3.43 \pm 0.16 ^{b, I}
R1	79.70 \pm 0.95 ^{b, I}	83.66 \pm 1.17 ^{b, II}	3.97 \pm 0.11 ^{b, II}	3.59 \pm 0.18 ^{b, I}
R2	72.76 \pm 0.42 ^{a, I}	76.83 \pm 0.52 ^{a, II}	3.98 \pm 0.20 ^{b, I}	3.74 \pm 0.27 ^{b, I}
R3	71.60 \pm 0.27 ^{a, I}	76.35 \pm 0.60 ^{a, II}	4.91 \pm 0.14 ^{c, II}	2.73 \pm 0.24 ^{a, I}
R4	78.81 \pm 1.00 ^{b, I}	82.11 \pm 0.63 ^{b, II}	5.97 \pm 0.24 ^{d, II}	3.60 \pm 0.17 ^{b, I}
R5	78.13 \pm 0.63 ^{b, I}	81.11 \pm 2.41 ^{b, II}	2.39 \pm 0.16 ^{a, I}	2.46 \pm 0.07 ^{a, I}

a-e: Las medias en la misma columna con diferente letra tienen diferencia significativa ($P < 0.05$).

I, II: Medias en la misma fila con diferente letra tienen diferencia significativa ($P < 0.05$) para cada parámetro

*Sin extracción de proteínas, T_p = Temperatura de pico, ΔH = entalpía de transición, R1= ausencia de globulinas y albúminas solubles en agua, R2 = ausencia de albuminas y globulinas, R3 = ausencia de albúminas, globulinas, α -, β -, δ -zeínas y proteínas tipo zeínas, R4 = ausencia de albúminas, globulinas, α -, β -, δ -zeínas, proteínas tipo zeínas y γ -zeínas y proteínas tipo glutelinas y R5 = ausencia de todas las proteínas extraíbles.

El aumento en la temperatura pico de gelatinización para las muestras sin cal se atribuyó a que el tiempo de cocción fue más largo, lo que aumentó la estructura cristalina del almidón. Aunque la temperatura de cocción (90° C) estaba por encima de la temperatura de gelatinización del almidón de maíz (alrededor de 65° C), la difusión en los granos secos es más lenta a causa de la presencia del pericarpio el cual podría estar creando un entorno para el recocido (annealing en inglés), sin

embargo, aún se produjo la gelatinización como se evidencia por la disminución de la entalpía para la mayoría de las muestras sin cal. Los residuos R1, R4 y R5 mostraron mayor T_p que la muestra control (sin proteína extraída) tanto para las muestras con cal como para las muestras sin cal. Se sabe que la mayoría de las sales, provocan un aumento de la temperatura de gelatinización, incluso cuando se encuentran a baja concentración (Medcalf *et al.*, 1966; Oosten, 1982). En consecuencia, es posible que después de la extracción secuencial de proteínas, algunos de los componentes de los solventes permanezcan en pequeñas cantidades en cada fracción, lo que afecta a la temperatura de gelatinización y termina por incrementarla. Es posible que tanto CaR1 como CaR4 contengan algunas sales de cloruro de sodio a partir de la extracción anterior de proteínas y CaR5 podría contener algunas de las sales de sodio disociada del SDS.

Las muestras tratadas con cal, mostraron valores más elevados en la entalpía de gelatinización, que las muestras control (tabla 6). Se sabe que cuando hay mayor entalpía de gelatinización hay menos almidón gelatinizado en la muestra. Estos hechos sugieren que la cal favorece la hidratación del núcleo, pero podría no promover una gelatinización más intensa. Los resultados coinciden con los obtenidos por Mondragón *et al.* (2004), quienes afirmaron que un tiempo de cocción más largo, produce la gelatinización del almidón en un grado más alto, por lo tanto, se obtienen los valores de entalpía inferiores. Varias investigaciones han mencionado que para mejorar la interacción del calcio con el almidón, el pH alcalino y la ionización parcial de los grupos OH pueden ser factores muy importantes que intervengan en el proceso (Robles *et al.*, 1988; Bryant y Hamaker, 1997).

Por otro lado, cuando las globulinas (y parte de las albúminas) fueron retiradas de las muestras cocidas con cal (CaR1), la entalpía de gelatinización disminuyó significativamente (de 4.80 a 3.97 J/g), esto al compararlas con muestras en donde la proteína no había sido extraída. Estos resultados sugieren que la presencia de globulinas (y algunas albúminas) estabiliza a los cristales de almidón.

En otras palabras, este efecto es posiblemente por las interacciones globulinas-almidón que protegen el gránulo. Contrario a esto, cuando las globulinas (y parte de las albúminas) fueron retiradas en las muestras cocidas sin cal (NCaR1), no se observaron cambios significativos de entalpía de gelatinización lo que podría confirmar la protección de la interacción proteína-calcio-almidón. La ausencia de albuminas en ambas muestras (CaR2 y NCaR2) no modifica significativamente la entalpía de gelatinización pues como se indicó anteriormente apenas quedaban albúminas en la muestra.

La entalpía incrementa en CaR3 (de 3.98 a 4.91 J/g) y en CaR4 (de 4.91 a 5.97 J/g) para muestras cocidas con cal; sin embargo, esta tendencia no es igual para las muestras NCaR3 y NCaR4. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el calcio puede estar interactuando con las zeínas, proteínas tipo zeínas y proteínas tipo glutelina de tal manera que debilitan la integridad del almidón. En otras palabras, cuando estas proteínas (albúminas, globulinas, α -, β -, δ - zeínas y tipo zeínas) se retiran, la estructura del almidón se hace más ordenada lo que provoca su estabilidad, que es la razón de que la entalpía haya aumentado significativamente. Probablemente, la última fracción que se extrae (glutelinas) es la que más protege al gránulo de almidón y lo estabiliza, ya que al estar presente la entalpía alcanza su valor máximo.

Finalmente, la ausencia de todas las proteínas mencionadas anteriormente extraídas en las muestras cocidas con cal, debilitó el cristal de almidón gelatinizado en comparación con CaR1, CaR2, CaR3, CaR4 y las muestras control. Cuando todas las proteínas extraíbles fueron retiradas de las muestras, el cristal de almidón gelatinizado se debilitó significativamente. En general, estos resultados sugieren que las globulinas y glutelinas aumentan la estabilidad del gránulo de almidón, contrario a las zeínas, las cuales lo desestabilizan. Se cree que es porque durante la cocción algunas zeínas se polimerizan (como se vio en los patrones de electroforesis Figuras 5 y 6) formando una red con la cal que daña

al almidón. Las glutelinas son la fracción que más protegió al almidón probablemente debido a que son las proteínas que más interactúan con él.

La función de las proteínas en general se manifiesta a través de una compleja serie de interacciones entre la proteína y su entorno molecular, es más evidente en el caso de las interacciones de las proteínas con cofactores, sustratos, enzimas modificadoras, metabolitos, proteínas alostéricas de orientación y otras especies macromoleculares de unión. Esto explica que cause una compleja red de interacciones con los iones del agua y del soluto que deben ser reemplazadas cuando la proteína se abre e interactúa con sus análogas (Tompa *et al.*, 2006).

Además de los puentes de disulfuro y de calcio, la polimerización de proteínas puede implicar enlaces covalentes, fuerzas hidrofóbicas o fuerzas de Van Der Waals y que también pueden ocurrir entre monómeros de proteína. Los enlaces electrostáticos e hidrófobos son especialmente importantes en la interacción proteína-carbohidrato. Las Fuerzas de Van der Waals pueden ocurrir entre los carbohidratos no polares y las cadenas laterales de los aminoácidos no polares en las proteínas. En presencia de agua, las interacciones pueden reforzarse mediante una unión hidrófoba, la existencia de la cual depende la energía favorable resultante de la exclusión de agua (Shewry y Halford, 2002).

6. CONCLUSIONES

1. La nixtamalización elimina las albúminas solubles en agua y favorece el aumento del porcentaje de zeínas y glutelinas como consecuencia de una mayor polimerización de las proteínas.
2. El análisis de las fracciones proteicas por electroforesis no reveló grandes diferencias entre las muestras nixtamalizadas y control, excepto una mayor polimerización en las muestras control que fueron cocidas por más tiempo.
3. La nixtamalización redujo tiempos de cocción a la mitad y ayudó a la menor gelatinización del almidón presentando valores más altos de entalpía las muestras nixtamalizadas que las muestras control (cocidas sin cal).
4. Al aumentar el tiempo de cocción la temperatura pico de gelatinización (T_p) aumentó debido a procesos de recocción. Así mismo la presencia de sales de sodio (NaCl y SDS) también incrementó la T_p tanto en las muestras cocidas con cal como en las muestras sin cal.
5. Respecto a la entalpía de gelatinización, en la harina nixtamalizada se observó que globulinas y albúminas solubles en sal, así como glutelinas estabilizan al almidón aumentando dicho valor, efecto no observado en las muestras de harina cocidas sin cal.
6. La presencia de zeínas (proteínas más abundantes) desestabiliza el gránulo de almidón disminuyendo los valores de entalpía.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Bello, P. L. A., Osorio, D. P., Agama, A. E., Núñez, S. C. y Paredes, L. O. (2002). Propiedades químicas, fisicoquímicas y reológicas de masas y harinas de maíz nixtamalizado. *Agrociencia*, 36:319-328.
- Boyer, C.D. y Shannon, J.C. (1987). Carbohydrates of the kernel. En S.A. Watson y P.R. Ramstad, eds. *Corn: chemistry and technology*. St Paul, Minn., EE.UU. Am. Assoc. *Cereal Chemistry*, 253-272
- Bressani, R. y Mertz, E.T. (1958). Studies on corn protein. IV. Protein and amino acid content of different corn varieties. *Cereal Chemistry*, 35:227-235.
- Bressani, R., Benavides, V., Acevedo, E. y Ortiz, M. A. (1990). Changes in selected nutrient contents and in protein quality of common and quality-protein maize during tortilla preparation. *Cereal Chemistry*, 67(6): 515-518.
- Bressani, R., y Billeb, A. C. (2001). Características de cocción por nixtamalización de once variedades de maíz. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*, 51:86- 94.
- Bressani, R. y Scrimshaw, N. S. (1958). Effect of lime treatment on in-vitro availability of essential amino acids and solubility of protein fractions in corn. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 6:774-778
- Bryant, C. M., & Hamaker B. R. (1997). Effect of lime on gelatinization of corn flour and starch. *Cereal Chemistry*, 74:171–175.
- Burge, R. M. y Duensing, W. J. (1989). Processing and dietary fiber ingredient applications of corn bran. *Cereal Foods World*, 34:535-538.
- Cameron, D. K. y Wang, Y. J. (2006). Application of protease and high-intensity ultrasound in corn starch isolation from degermed corn flour. *Cereal Chemistry*, 83:505-509.
- Campus, B. O. N., Rosas, B. E. C., Torres, C. P. I., Ramírez, W. B. y Serna S. S. O. (1999). Physicochemical changes of starch during maize tortilla production. *Starch*, 51(5):173-177

- Colección FAO “El maíz en la alimentación humana”. Alimentación y nutrición, Número 25, Roma Italia, 1993; (ISBN: 92-5-303013-5).
- CONABIO 2012 El maíz, sus razas y parientes silvestres. Comunicado de prensa CONABIO. Número 109, México, D.F. Consultado el día 26 noviembre 2012, de http://www.conabio.gob.mx/web/medios/pdf/bp109_razas_maiz_teocintle_280912.pdf
- Cornejo, V. M. A., Gutiérrez, C. E., Rojas, M. I., Real, L. A., Zambrano, Z. M. L., Martínez, V. V., y Rodríguez, G. M. E. (2013). Physicochemical, morfological, and pasting properties of nixtamalized flours from quality protein maize and its particle distribution. *Food Science and Technology*, 53:81-87.
- Doudu, K. G., Nunes, A., Delgadillo, I., Parker, M. L., Mills, E. N. C. P. S., Belton, O. S. y Taylor, J. R. N. (2002). Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize in vitro protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, 35:161-174.
- Emmabux, M. N., & Taylor, J. R. N. (2009). Properties of heat-treated sorghum and maize meal and their prolamin proteins. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 57:1045-1050.
- Esen, A. (1987). A proposed nomenclature for alcohol – soluble proteins (zeins) of maize (*Zea mays* L). *Journal of Cereal Science*, 5:117-128
- Esen A. y Stetler, D. A. (1992). Immunocytochemical localization of δ -zein in the protein bodies of maize endosperm cells. *American Journal of Botany*, 73:243-248.
- Evans, I. D. y Haisman, D. R. (1982). The effect of solutes on the gelatinization temperature range of potato starch. *Starch*, 34:224-231
- FAO 2011. Energy and protein requirements. Consultado el 10 de diciembre 2013, FAO Nutrition Meetings Report Series No. 52; WHO Technical Reports Series No. 522: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5686e/y5686e00.pdf>
- Fenemma, O.R. 2000. Química de los Alimentos. 2ª edición. Ed. Acribia. Zaragoza. España.

- Flores, F. R., Martínez, B. F., Salinas, M. Y., Chang, Y. K., González, H. J. y Ríos, E. (2000). Physicochemical and rheological characteristics of commercial nixtamalized Mexican maize flours for tortillas. *Journal Science of Food and Agriculture*, 80:657-664.
- Galinat, W.C. (1977). The origin of corn. Sprague, ed. Corn and corn improvement. *American Society of Agronomy*, p. 1-47.
- Goertz, P., Pollmer, W.G., Villegas, E. y Dhillon, B.S. (1978). Nutritional quality of Andean maize collections and comparisons of some chemical screening methods. *Maydica*, 33:221-232.
- Gómez, M. H., Lee, J K., McDonough, C. M., Waniska, R. D. y Rooney, L W. (1992). Corn starch changes during tortilla and tortilla chip processing. *Cereal Chemistry*, 69:275-279
- Gómez, R. S., Sierra, A. I. y Pérez, Q. D. (2009). Análisis Instrumental. Primera Edición. Netbiblio. p 205-207
- Grobman, A., Salhauana, W. y Sevilla, R. 1961. Races of maize in Peru: their origins, evolution and classification. Publication 915. Washington, DC, National Academy of Sciences, National Research Council.
- Gutiérrez, E., Rojas, M. I; Pons, H. J. L; Guzmán, H., Aguas, A. B., Arenas, J., Fernández, P., Palacios, F. A., Herrera, G. y Rodríguez, M. E. (2007). Study of calcium ion diffusion in nixtamalized quality protein corn as a function of cooking temperatura. *Cereal Chemistry*, 84(2):186-194.
- Hinton, J. J. C. (1953). The distribution of protein in the maize kernel in comparison with that in wheat. *Cereal Chemistry*, 30: 441 – 445.
- Hoffman, L., Stein, R. A., Colbran, R. J. y Mchaourab, H. S. (2011). Conformational changes underlying calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activation. *The Embo Journal*, 30(7):1185-1413.
- Ibarra, M. M. H., Gallardo, N. Y. T., Torres, P. I. y Ramírez, W. B. (2008). Effect of processing conditions on instrumental evaluation of nixtamal hardness of corn. *Journal of Texture Studies*, 39:252 – 266.

- Kato, T., Mapes, C., Mera, L., Serratos, J. y Bye, R. 2009. Origen y diversificación del maíz, una revisión analítica. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Landry, J. y Moureaux, T. (1970). Hétérogénéité des glutelinas du grain de maïs: Extraction sélective et composition en acides aminés des trois fractions isolées. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 52:1021-1037.
- Landry, J., Paulis, J. W., Fey, D. A., (1983). Relationship between alcohol-soluble proteins extracted from maize endosperm by different methods. *Journal of Agriculture of Food and Chemistry*, 31:1317-1322.
- Laria, J., Meza, E., Mondragón M., Silva, R. y Peña J. L. (2005). Comparison of overall water uptake by corn kernel and without dissolved calcium hydroxide at room temperature. *Journal of Food Engineering*, 67:451-456
- Lásztity, R. 1996. Maize proteins in *The Chemistry of Cereal Proteins*. 2nd ed. Boca Raton, FL. p 185 -225.
- Lawton, J. W. (2002). Zein: A history of processing and use. *Cereal Chemistry*, 79:1-18.
- Makeda, H; y Kokini, J. L. (1992). Effect of addition of zein and gliadin on the rheological properties of amylopectin starch with low-to-intermediate moisture. *Cereal Chemistry*, 69(5):489-494.
- Malumba, P., Vanderghem, C., Deroanne, C. y Béra, F. (2008). Influence of drying temperature on the solubility, the purity of isolates and the electrophoretic patterns of corn proteins. *Journal of Food Chemistry*, 111:564–572.
- Martínez, J., Rivera, N. y Riveros, A. (2010). Calorímetro de barrido diferencial. Colombia: Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.
- Medcalf, D. G., Gilles, K. A., Tombetta, E. E., y Banasik, O. J. (1966). A rapid procedure for alpha-amylase determination in malt. *Cereal Chemistry*, 43:675-681.
- Mohiedeen, E. I., Abdullahi, H. E., Abd Elmoneim, O. E., Elfadil, E. B. y Mallasy, L. O. (2010). Effect of fermentation and cooking on protein quality of maize (*Zea*

mays L.) cultivars. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(6):1284-1290.

- Mondragón, M., Bello-Pérez, L. A., Agamma, A. E., Betancur, A. D. y Peña, J. L. (2004). Effect of cooking time, steeping and lime concentration on starch gelatinization of corn during nixtamalization. *Starch/Stärke*, 56:248-253.
- Nonthanum, P., Youngsoo, L. y Padua, G. W. (2012). Effect of γ -Zein on the Rheological Behavior of Concentred Zein Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(7):1742-1747.
- Oosten, B. J. (1982). Tentative hypothesis to explain how electrolytes affect the gelatinization temperature of starches in water. *Starch*, 34:233-239.
- Ortega, E. I., Villegas, E., y Vasal, S. K. (1986). A comparative study of protein changes in normal and quality protein maize during tortilla making. *Cereal Chemistry*, 63(5):446-451.
- Osborne, D. R. y Voogt, P. 1986. Análisis de los nutrientes de los Alimentos. Editorial Acribia
- Owens, F. N., Zinn, R. A. y Kim, Y. K. (1986). Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *Journal of Animal Science*, 63:1634-1648.
- Paredes, O. L., Guevara, L. F. y Bello, P. L. A. (2009). La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias de la UNAM*, 92-93.
- Paulis, J. W. y Wall, J. S. 1971. Fraction and properties of alkylated – reduced corn glutelina proteins. *Biochemistry. Acta*, 251: 57 -69.
- Quintanar G. A. Estudio del efecto de los cambios en las proteínas del grano de maíz (*Zea mayz sp*) nixtamalizado sobre las propiedades viscoelásticas de la masa. México, D.F. 2009. Presentada en el Instituto Politécnico Nacional para obtener el grado de Doctor en Ciencias en Alimentos.
- Quintanar, G. A., Jaramillo, F. M., Solorza, F. J., Méndez, M. M. y Wang, Y. J. (2010). Rheological and thermal properties of masa as related to changes in corn protein during nixtamalization. *Journal of Cereal Science*, 53:139-147.

- Robles, R. R., Murray, E. D., y Paredes, L. O. (1988). Physicochemical changes of maize starch during the lime cooking treatment for tortilla making. *International Journal of Food Science and Technology*, 23:91–98.
- Rojas, M. I., Gutiérrez, E., Cortés, A. M. E., Falcón, A., Bressani, R., Rojas, A., Ibarra, C., Pons, H. J. L., Guzmán, M. S. H., Cornejo, V. A., y Rodríguez, M. E. (2008). Analysis of quality protein changes in nixtamalized QPM flours as a function of the steeping time. *Cereal Chemistry*, 85(3):409-416.
- Sahai, D., Buendía, M. O. y Jackson, D. S. (2001). Analytical techniques for understanding nixtamalized corn flour. Particle size and functionality relationships in masa flour sample. *Cereal Chemistry*, 78:14-18.
- Sandstead, H. H., Muñoz, J. M., Jacob, R. A., Klevay, L. M., Reck, S. J., Logan, G. M; Dintzis, F. R; Inglett, G. E. y Shuey, W. C. (1978). Influence of dietary fiber on trace element balance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 31:1497-1503.
- Serna, S. S. O., Gómez, M.H. y Rooney, L. W. 1994. Food uses of regular and specialty corns and their dry milled fractions. In A.R. Hallauer, ed. *Specialty corns*. Boca Raton, FL, USA. p 263-298.
- Serna, S. R. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. 2009 2da edición. México, pp 55-68.
- Shewry, P. R., & Halford, N. G. (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53(370): 947-958.
- Singh Singh, N., Singh, J., Kaur, L., Sodhi, S.N., & Gill, B.S. (2003). Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chemistry*, 81:219-231.
- Steel, R. G; y Torrie, J. H. Principles and Procedures of Statistics, A Biometrical Approach. New York 1980. McGraw-Hill p 43-98.
- Suriñach, S., Baro, M. D., Bordas, S., Clavaguera, N. y Clavaguera, M. M. T. (1992). La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de los materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 31(1):11-17.

- Thompson, G. A. y Larkins, B. A. (1989). Structural elements regulating zein gene expression. *Biological Essays*, 10:108-113.
- Tompa, P., Banki, P., Bokor, M., Kamasa, P., Kovacs, D., Lasanda, G. y Tompa, K. (2006). Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophys Journal*, 91:2243–2249.
- Vivas, N. E., Waniska, R. D. y Rooney, L. W. (1987). Effect of tortilla production on protein in sorghum and maize. *Cereal Chemistry*, 64:384.
- Wall, J. S., Cooker, L. A., & Bietz, J. A. (1988). Structure and origin of maize endosperm alcohol-insoluble glutelin. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 36:722-728.
- Watson, S. A. (1987). Structure and composition. En S.A. Watson y P.E. Ramstad. eds. Corn: chemistry and technology. *Cereal Chemistry*, 53-82.
- White, P. J. y Johnson, L. A. Corn: Chemistry and technology. 2003. American Association of Cereal Chemistry, Inc. St. Paul, Minnesota, USA.
- Wilson, C. M. (1985). Nomenclature for zein polypeptides based on isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 62:361-365.
- Wilson, C. M. (1987). Proteins of the kernel. Corn: Chemistry and Technology. Primera Edición. Assoc. *Cereal Chemistry*, p 273-310.
- Wolf, M. J., Buzan, C. L., MacMasters, M. M. y Rist, C.E. (1952). Structure of the mature corn kernel. *Cereal Chemistry*, 29: 321-382.
- Wolf, M.J., Khoo, V. y Seckinger, H.L. (1969). Distribution and subcellular structure of endosperm protein in varieties of ordinary and high-lysine maize. *Cereal Chemistry*, 46: 253-263.
- Zhang, L., Peek, S. A., Dunams, D y Gaut, S. B. (2002). Population Genetics of Duplicated Disease-Defense Genes, hm1 and hm2, in Maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.) and Its Wild Ancestor (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics Society of America*, 162(2):851-860.