

Brigard & Castro
Abogados

Apartado 3692

Cra. 7 16-56
Bogotá - Colombia S.A.

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO

Radicación: 81183509 0308281

Fecha REC: 2002-01-30 16:39:14

Trámite: 032 PATENTES D

Dependencia: 8226 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 74

Tel. Conn. 3802200

Tel./Fax: (57.1) 2827976

(57.1) 3802700

E.Mail:bricas@brigardycastro.com.co

AS: 85.926

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

REF: Expediente No. 01 103.809 – Solicitud de Patente

a favor de **MANUEL J. RUBIO, ROBERTO CONTRERAS y MARCO A. BAEZ**

Titulada: **MÉTODO PARA HACER UNA MASA DE MAIZ PARA PRODUCIR TORTILLAS CON MEJORADA RETENCIÓN DE TEXTURA UTILIZANDO UNA HARINA DE MAIZ NIXTAMALIZADA Y UNA MEZCLA DE ENZIMAS A BASE DE HEMICELULOSA Y/O CELULOSA**

RAMIRO CASTRO DUQUE, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 1003, obrando como apoderado de **MANUEL J. RUBIO, ROBERTO CONTRERAS y MARCO A. BAEZ**, me permito anexar al presente escrito los siguientes documentos:

1. Copia certificada por la Oficina de Patentes de Estados Unidos de la primera solicitud presentada para la misma invención, de la cual REIVINDICAMOS PRIORIDAD, junto con su correspondiente traducción del inglés al castellano.
2. Nueva copia de la descripción y reivindicaciones, debidamente traducida del inglés al castellano.

Del señor Jefe atentamente,


RAMIRO CASTRO DUQUE
C.C. No. 170.322 de Bogotá
Código 340
Cra 7 No. 16-56 Piso 9

Bogotá, Enero 29, 2002
CPB/hsr.

**TORTILLAS DE MAÍZ CON RETENCIÓN MEJORADA DE TEXTURA USANDO
UNA MEZCLA DE ENZIMAS EN HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADA**

---oo0oo---

RESUMEN

La textura de la masa de maíz y la flexibilidad de la tortilla son mejoradas añadiendo a la harina de maíz nixtamalizada una mezcla de enzimas que comprende hemicelulasa comercial y/o celulasa. La preparación de enzimas tiene un efecto positivo sobre la textura de la masa y mejora la elasticidad y ductilidad de la tortilla durante el almacenaje comercial. La combinación de la mezcla de enzimas y el método para la preparación de la masa y la tortilla puede aumentar el efecto de los aditivos convencionales para retardar el endurecimiento de la tortilla de maíz durante el almacenaje.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

Esta invención se refiere a un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de maíz, y mejorar la retención de textura de tortillas de maíz producidas a partir de la misma.

2. Descripción del Arte Relacionado

Una harina de masa de alta calidad puede ser producida por técnicas convencionales solamente si el maíz dentado de grado alimenticio tiene las siguientes características: uniformidad en el tamaño y la dureza del grano, pocas hendiduras de esfuerzo y poco daño del grano, y facilidad de remoción del pericarpio durante el proceso de cocción en agua de cal. La harina de maíz nixtamalizada es producida mediante cocción alcalina del maíz, lavado, molienda del nixtamal y secado para proporcionar una harina de masa de maíz. Esta harina es tamizada y mezclada para diferentes aplicaciones del producto y es usualmente suplementada con aditivos antes de ser envasada para la producción comercial de tortillas de mesa y bocadillos. MASECA es la principal marca de harina de maíz nixtamalizada en los Estados Unidos y Latinoamérica, seguida por Minsa, Agroinsa, Illinois Cereal Mills (Cargill) y Quaker Oats (Sustain, 1997). Aunque el pericarpio es parcialmente removido durante las etapas de proceso de cocción alcalina y lavado, aún queda fibra proveniente del grano de

maíz (Patente de EE.UU. 4.513.018; Montemayor & Rubio, 1983). A diferencia del trigo entero, en el cual la fibra soluble representa 11% de la fibra total, la fibra soluble del maíz es despreciable (1%).

De acuerdo con Watson (1987), el pericarpio del maíz representa 5-6% del peso seco del grano. También contiene 67% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0,6% de fibra soluble. Las paredes celulares primarias de la aleurona y el endospermo almidonado (83% de peso seco) consisten predominantemente en arabinoxilano, β -glucano y algo de celulosa. Se estima que la fibra principalmente insoluble en el pericarpio y endospermo representa 78% de la fibra dietética total (9,5% en el peso seco del grano).

Los arabinoxilanos son polímeros complejos (20.000-170.000 daltons) con una estructura de soporte lineal de unidades de (1,4)- β -xilopiranosilo a las cuales los sustituyentes son unidos a través de átomos O2 y O3 de los residuos de xilosilo (principalmente, α -L-arabinofuranosilo; Fincher y Stone, 1986). Un alto grado de arabinosilación aumentará su solubilidad en agua y más de 20% del agua en la masa de harina de trigo está asociada con arabinoxilanos. Este polímero está aparentemente enlazado al esqueleto de celulosa en la pared celular del maíz por enlace transversal de éster a través de ácido ferúlico y diferúlico.

La harina de maíz nixtamalizada puede contener desde 7-9% de la fibra dietética total y 6-8% consiste principalmente en fibra insoluble en base al peso seco (Sustain, 1997). La fibra dietética de la nueva generación puede sobrepasar las cualidades funcionales y sensoriales de las fibras dietéticas standard (por ejemplo, la fuente comercial de salvado de trigo puede ser librada de su almidón, gluten y ácido fítico). Debido a su nueva estructura de fibra y su efecto capilar, la nueva fibra tiene una buena capacidad de contención de agua (doble) y un efecto positivo sobre la frescura de los productos horneados (por ejemplo, la denominación comercial Vitacel).

Haarasilta et al. (Patente de EE.UU. 4.990.343), Báez Vázquez y Schoefield (1993) y Tanaka et al. (Patente de EE.UU. 5.698.245) han propuesto que el uso de endo y exo-hemicelulasas causa descomposición de la fibra insoluble de trigo.

Componentes de fibra de las partes del grano de maíz

Parte	% materia seca	Fibra insoluble	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Fibra soluble	Fibra total	% fibra del grano
Grano entero	100	9,5	6,7	3	0,2	0,1	9,5	100
Endosperm o almidonado	80,9	1,0	-	-	-	0,5	1,5	12
Endosperm o de aleurona	2,0	50,0	-	-	-	25,0	75,0	15
Germen	11,0	11,0	18	7	1,0	3,0	14,0	16
Pericarpio (salvado)	5,3	90,0	67	23	0,1	0,6	90,7	51
Capa de punta	0,8	95,0	70	-	2,0	-	95,0	6

Fuente: Watson, S.A. 1987, Estructura y Composición, en *Corn Chemistry and Technology*

La celulosa y hemicelulosa naturales harían a la masa no homogénea y afectarían la capacidad de estiramiento de la masa, impidiendo la formación de una red de gluten (por ejemplo, gliadina que proporciona elasticidad y glutenina que afecta la viscosidad). El producto de pan tratado con enzimas tiene un volumen aumentado, una estructura de grano más uniforme, un envejecimiento más lento (enranciado o deterioro retardado) y una reducción o reemplazo en los aditivos de hornear. El beneficio de usar una xilanasa en vez de

una preparación de hemicelulasa tradicional (pentosanasa) es que hay una menor cantidad de actividades secundarias (por ejemplo, α o β -amilasa, β -xilosidasa/glucosidasa) en el producto de xilanasas. Un nivel adecuado de enzimas resulta en un reblandecimiento conveniente de la masa sin causar pegajosidad, mejorando de ese modo su capacidad de trabajado.

Los sistemas xilanolíticos (Wong y Saddler, 1992) incluyen xilanasas (1,4- β -D-xilan xilanhidrolasa, EC 3,2,1,8) y β -xilosidasas (1,4- β -D-xilan xilohidrolasa, EC 3,2,1,37), las primeras generalmente hidrolizan la estructura de soporte de xilano (tipo endo) mientras que las segundas hidrolizan los xilo-oligómeros (tipo exo). La xilosa no es usualmente el producto mayor y es típicamente producida después de la xilobiosa y la xilotriosa (el oligómero más pequeño). Unas xilanasas no específicas de *Trichoderma spp* pueden atacar a la celulosa y carboximetilcelulosa. Las xilanasas son clasificadas en dos familias mayores (F o 10 y G u 11) de glicosilhidrolasas. Las xilanasas F10 son más grandes, más complejas y producen oligosacáridos de bajo DP (menos específicos); F11 son más específicas para xilano (Jeffries, 1996). Las xilanasas de bajo peso molecular (269-809 residuos de aminoácido) eran de *B. pumilus*, *B. subtilis* y *C. acetobutylicum* (Wong y Saddler, 1992).

Las xilanasas pueden ser preparadas microbiológicamente por medio de hongos y bacterias: *A. niger* ha mostrado no solamente una actividad de xilanasas de liberación de arabinosa sino también una de xilotriosa, las xilanasas de *Trichoderma spp* tienen unas condiciones óptimas de actividad entre 45-65°C y pH 3,5-6,5, *Bacillus spp* tiene unas xilanasas termofílicas extremas y tolerantes a alcalinidad (hasta pH 10); y una xilanasas de *Thermotoga sp* (cepa FjSS3-B1) tiene un óptimo de temperatura de 105°C a pH 5,5 y una vida media de 90 minutos a 95°C.

En los últimos años ha habido un interés creciente en el uso de enzimas de xilanasas en las industrias del papel, pulpa (mejoran la capacidad de batido y la capacidad de adhesión), alimentos y alimentación. El uso de xilanasas (con o sin celulasa y pectinasa) ha sido

propuesto para clarificar jugos y vino, para extraer café, aceites vegetales y "almidón", para mejorar las propiedades nutritivas del ensilaje agrícola, para macerar paredes celulares de plantas, para producir espesadores de alimentos y para proporcionar "texturas a productos de panadería". El alcance para nuevas aplicaciones está restringido principalmente por la disponibilidad limitada de xilanasas específicas con la pureza, las propiedades (es decir, estabilidad térmica y óptimos de pH) y los patrones de acción (mecanismos endo o exo-hidrolíticos) requeridos. Las preparaciones comerciales de xilanasa comercializadas para tratamiento de pulpa incluyen Pulpzyme HA (con poca actividad celulolítica) de *T. reesei* y Albazyme de *T. longibrachiatum*. Las preparaciones de enzimas crudas que contienen hemicelulasas y celulasas podrían ser usadas para mejorar las propiedades de fibrilación y drenaje de las fibras de madera de pulpa recicladas (Wong y Saddler, 1992).

Para ayudar en estos desarrollos, se requieren procedimientos simples, confiables y sensibles para la medición cuantitativa de xilanasa en un grupo de productos con niveles de actividad enzimática mínimos a elevados. El advenimiento de la ingeniería genética ha permitido la producción de preparaciones enzimáticas muy específicas. Un grupo de polisacáridos de plantas, incluyendo almidón, β -glucano, arabinoxilano, fructanos, así como deterioro de almidón, pueden ser medidos (McCleary, 1992).

López-Munguía et al. (Solicitud de patente mexicana 952.200) describe un proceso enzimático para producir tortillas de maíz que retarda el enranciado acelerado con una mejora de la textura durante cuatro días de almacenaje a congelación. Una mezcla de α -amilasas de hongos (es decir, enzimas comerciales de Novo, Gist Brocades y Genencor International) fue añadida durante la rehidratación de harina de maíz Maseca (0,01 U/kg), y modificó el almidón durante la cocción de la tortilla hasta la temperatura de desnaturalización (Iturbe-Chinas et al., 1996).

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de maíz y las propiedades de las tortillas producidas a partir de la misma, añadiendo a la harina de maíz nixtamalizada una cantidad efectiva de un componente (o mezcla) de enzimas que contiene hemicelulasa y/o celulasa. Una masa preparada con esta premezcla de harina tendrá unas propiedades reológicas y de manipulación ventajosas y tolerancia en una máquina de tortillas mecanizada (Rodotec Ecológica-100; fabricada por Tecnomáiz Gruma, Monterrey, N.L., México). El producto de tortilla final mantendrá su flexibilidad y compresibilidad, incluso durante un almacenaje comercial prolongado. La tortilla producida de acuerdo con la invención tiene, por lo tanto, poca o ninguna necesidad de aditivos convencionales contra el enranciado.

La masa es producida combinando harina de maíz nixtamalizada, agua y una mezcla de hemicelulasa y/o celulasa, con aditivos si se desea, y mezclando y amasando para formar una masa adecuada para una producción de tortillas tanto tradicional como mecanizada. La invención también comprende una premezcla de harina para tortilla novedosa que incluye harina de masa de maíz, aditivos y una preparación enzimática con un portador adecuado incorporado directamente a la harina durante su producción.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una masa suave y cohesiva sin causar pegajosidad durante la elaboración de la tortilla. Otro objeto es proporcionar una tortilla de mesa con flexibilidad y capacidad de enrollado mejoradas durante el almacenaje comercial. El objeto principal de la invención es la aplicación de una mezcla de enzimas que comprende hemicelulasa comercial y/o celulasa para mejorar no solamente las propiedades reológicas de la masa de maíz, sino también la flexibilidad de las tortillas de mesa. El producto horneado o tortilla de maíz es elaborado combinando harina de maíz nixtamalizada con una cantidad adecuada de una preparación enzimática, aditivos y agua y mezclando y

amasando para producir una masa suave y cohesiva sin pegajosidad excesiva durante la producción mecanizada de tortillas.

Preferiblemente, la mezcla de enzimas contiene entre 500 y aproximadamente 5.000 unidades de una hemicelulasa comercial o aproximadamente 500 hasta aproximadamente 5.000 unidades de celulasa por kilogramo de harina de maíz. La premezcla de harina para tortillas incluye preferiblemente unos aditivos antimicrobianos comerciales (0,5-1% en peso) en combinación con la mezcla de enzimas antes de añadir la premezcla directamente a la harina en la fábrica de producción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES PREFERIDAS

Una tortilla puede ser definida como un panqueque plano, redondo, no fermentado, producido a partir de maíz cocido con cal (*Zea mays L.*). Tres tipos básicos de productos de maíz son elaborados industrialmente: tortillas de mesa, hojuelas de maíz y hojuelas de tortilla. Muchos fabricantes usan harina de masa de maíz debido a que no requiere mucha mano de obra o equipo, y los procesadores no tienen que pagar tanto para la eliminación de efluentes y el control de las prácticas de producción.

La mezcla de enzimas comprende aproximadamente 500-5.000 unidades por kilogramo de harina de maíz, preferiblemente calculadas como unidades de xilanasa. Una preparación comercial de hemicelulasa de hongo de *A. niger* fue gentilmente proporcionada por Amano Pharmaceutical Co. y otra hemicelulasa de componentes múltiples por Rhone-Poulenc (Rhodin). Una preparación de celulasa cruda de *T. longibrachiatum* (Fracción A; principalmente con actividades de endoxilanasa y celulasa) fue obtenida de Biotechnology Center (ITESM, Monterrey, N.L., México; Báez Vásquez y Schoefield, 1993).

Las definiciones de las diferentes actividades enzimáticas son definidas a continuación:

Actividad de xilanasa (Megazyme International Ireland, Ltd., Irlanda). Un ensayo de azúcar reductor Somogyi-Nelson modificado para la medición de β -xilanasa usando

Arabinoxilano de Trigo como sustrato (procedimientos de ensayo de Megazyme XYL 9/95:14-45). Una unidad es la cantidad de enzima que produce un micromol de xilosa por minuto a pH 4,7 y 40°C. (Fracción A: resultado de prueba 1.400 micromoles de xilosa/min-g). Las mayores ventajas de este procedimiento son que la respuesta de color con oligosacáridos de grado creciente de polimerización es estequiométrica, y el ensayo es muy sensible (10-50 µg).

Rhodia-Rhone Poulenc reportó una actividad de xilanasa mínima (hemicelulasa de componentes múltiples) de 4.000 U/gramo (4.000 mg de maltosa/min-g) o azúcar reductor equivalente a 5.850 µmoles de glucosa/min-g (ensayo DNS).

Actividad de hemicelulasa (Amano-Enzyme USA Co., Ltd.). Se usó un ensayo de Somogyi-Nelson y una unidad es la cantidad de enzima que produce azúcar reductor equivalente a diez microgramos de xilosa por minuto a pH 4,5 y 40°C (Amano-90; resultado de prueba 109.000 U/gramo o 7.270 micromoles de xilosa/min-g).

La preparación enzimática puede contener actividad de xilanasa que funciona con mecanismos tanto endo como exo. Puede también contener las siguientes actividades secundarias enzimáticas: α -amilasa (Amano-90), β -xilosidasa (Amano-90) y β -glucosidasa (Fracción A y Amano-90).

Ejemplo 1

Preparación de una tortilla de maíz al estilo tradicional, mostrando el efecto de la mezcla de enzimas sobre la textura de la tortilla

Un estudio de vida en almacenaje fue diseñado con tortillas de maíz de laboratorio almacenadas a temperatura ambiente, y sus cambios de flexibilidad y compresibilidad fueron registrados, simulando siete días de almacenaje.

Se usaron enzimas comerciales (Amano-90: mezcla código AM de *A. niger*, y Rhodia-Rhone Poulenc: mezcla código RP) así como un extracto de celulasa cruda de *Trichoderma longibrachiatum* (Fracción A: mezcla código A de Biotechnology Center - ITESM). Se probaron tres formulaciones de enzimas en harina de maíz: formulación 1 (0 U/k o control), formulación 2 (500 U/k) y formulación 3 (5000 U/k).

Todos los tratamientos usaron harina de maíz nixtamalizada (tipo disponible comercialmente) y una masa fina (masa de maíz) fue preparada manualmente por rehidratación de harina con agua tibia (30°C) en una relación 1:1,25, y añadiendo un aditivo antimicrobiano líquido (1% en base a la harina; marca Kemin). En los experimentos que incluyeron enzimas, la actividad enzimática apropiada de harina fue disuelta en el agua tibia con el aditivo y amasada manualmente durante un minuto. La temperatura de la masa era aproximadamente 28°C y unas bolas de masa fueron divididas manualmente y pesadas (25 gramos cada una). Las bolas de masa fueron aplanadas con una máquina manual para tortillas (Productos Prácticos, S.A.) para controlar el espesor del disco en aproximadamente 0,2-0,3 cm (80-125 milipulgadas). Los discos planos de masa fueron cocinados en una plancha caliente (185°C) y después de 15 segundos la tortilla fue volteada para cocinar el otro lado. El lado expuesto se calentó después de otros 15 segundos y finalmente la tortilla fue volteada nuevamente durante 15 segundos hasta que el vapor producido la hizo hincharse. Después de enfriar las tortillas (0,2 cm u 80 milipulgadas de espesor) a temperatura ambiente, fueron envasadas en bolsas de polietileno y selladas para su almacenaje.

Para evaluar el efecto de todos los tratamientos sobre la flexibilidad, las tortillas fueron recalentadas sobre una plancha caliente por 20 segundos y enfriadas por cinco minutos antes

de analizar su textura. La medición de flexibilidad usó unas varillas de acero inoxidable de varios diámetros (0,5 a 3 cm), enrollando la tortilla entibiada en un orden decreciente de tamaños, y registrando el número de la varilla en el cual la muestra de tortilla simplemente se rompe cuando es flexionada (Patente de EE.UU. 3.730.732). Una tortilla más flexible sólo se romperá cuando sea doblada alrededor de un diámetro más pequeño de varilla en comparación con una tortilla menos flexible. Una prueba de compresibilidad usó un procedimiento que medía la distancia relativa cuando se comprimían tres tortillas almacenadas con un peso standard. Esta prueba de compresión es una deformación uniaxial de un alimento sólido bajo una fuerza constante y estima una deformación elástica instantánea de la tortilla. Una prueba indirecta de capacidad de enrollado consistía en enrollar la tortilla entibiada como un cilindro y entonces registrar su diámetro promedio con un Vernier sin romper la tortilla entibiada.

Los resultados de laboratorio de los tratamientos enzimáticos fueron los siguientes:

Textura de tortilla de maíz Fórmula (3=5.000, 2=500, 1=0 U/k)

Flexibilidad 1 día 3 > 2 > 1

7 días 3 > 2 > 1

Compresibilidad (elasticidad) 1 día 3 > 2 > 1

6 días 3 > 2 > 1

Capacidad de enrollado Después de 6 días, 1 > 3 = 2

Contenido de humedad (%) 7 días 3 = 2 > 1

Los tratamientos de las tortillas a los cuales una alta dosis de la mezcla de enzimas (AM y RP a 5000 U/k) fue añadida fueron excelentes en las evaluaciones standard de laboratorio en comparación con los tratamientos de control y enzima A. Una baja actividad

enzimática y específica en la mezcla A de extracto crudo, en comparación con las enzimas comerciales, pudiera haber causado un bajo efecto durante el almacenaje de la tortilla.

Debido a la adición de enzimas comerciales durante la hidratación de la harina de maíz nixtamalizada y el amasado de la masa, la flexibilidad, la compresibilidad y la capacidad de enrollado de las tortillas fueron mejoradas. Las actividades de las enzimas de despolimerización de arabinoxilano (hemicelulasas) del pericarpio de maíz insoluble pueden ser relativamente bajas; no obstante, se cree que tienen un impacto favorable sobre las tortillas debido a que las hacen más solubles (con capacidad superior de retención de agua) y una tendencia a ser más suaves (menos elásticas que la tortilla de control).

La tortilla al estilo tradicional es usualmente producida sin uso adicional de emulsores y gomas, y por lo tanto tiene usualmente una vida en almacenaje limitada debido al deterioro microbiano y al enranciado. Se cree que el endurecimiento o pérdida de flexibilidad (35% después de 4 días a temperatura ambiente) es causado por deterioro del almidón. La adición de materiales alcalinos comestibles solubles en agua (1%) a la masa de maíz aumenta notablemente el rendimiento de masa (2,29) y tortilla (1,81) por kilogramo de harina de maíz tratada con cal (Patente de EE.UU. 3.730.732).

Así, un pericarpio de maíz soluble puede impartir no solamente una capacidad de retención de agua, sino también cohesividad y plasticidad a la masa de maíz para la elaboración de tortillas tradicionales. Un modelo de masa de maíz puede ser descrito como una mezcla lisa, cohesiva y plástica de grandes trozos de endospermo ligados por una dispersión coloidal (5-9% de masa total). Esta dispersión similar a una cola es elaborada a partir de almidón soluble, proteína y polisacáridos diferentes al almidón que forman una matriz hidratada en la cual las partículas de endospermo están suspendidas.

Ejemplo 2

Preparación de tortillas mecanizadas, mostrando el efecto de la mezcla de enzimas sobre la masa de maíz y las tortillas elaboradas a partir de las mismas

Una prueba de vida en almacenaje fue realizada sobre tortillas mecanizadas almacenadas a temperatura ambiente, con evaluaciones de laboratorio standard realizadas durante su almacenaje de siete días. Las mediciones de la masa de maíz antes de la elaboración de la tortilla incluyeron consistencia (grado de resistencia a la penetración o firmeza: Penetrómetro Universal, Precision Scientific, Inc.) y adhesividad (relación de esfuerzo de ruptura de adhesión a esfuerzo de ruptura de cohesión: Patente de EE.UU. 3.788.139). Unas masas plásticas que son suaves y adhesivas pueden ser medidas, posibilitando así la determinación de la adhesión cuando la cohesión es conocida. Las pruebas de textura de la tortilla durante el almacenaje comprendieron flexibilidad (resistencia al doblado con un método usado en la Patente de EE.UU. 3.730.732) y compresibilidad (resistencia a la compresión con el mismo método que en el Ejemplo 1). Un índice de flexibilidad superior corresponde a unas varillas de menores radios e indica una flexibilidad superior de las tortillas.

Las pruebas piloto sobre las tortillas mecanizadas fueron llevadas a cabo añadiendo a la harina de maíz nixtamalizada (tipo disponible en el comercio) un aditivo de goma soluble en agua comercial y dos mezclas de enzimas comerciales: Formulación 1 (Control), Formulación 2 (Carboximetilcelulosa Sodio - Amtex, 2500 ppm), Formulación 3 (Amano-90, 500 U/k según lo recomendado) y Formulación 4 (Hemicelulasa - Rhodia, 5000 U/k).

La masa de maíz fue elaborada mecánicamente como sigue: la harina de masa de maíz y los aditivos secos fueron mezclados por 5 minutos (mezcladora de masa, Tecnomáiz - Gruma), se añadió agua potable tibia (relación 1,2:1 a 30°C) con un aditivo antimicrobiano (0,8% Kemin, en base a la harina) y la masa de maíz resultante fue amasada por 5 minutos.

Posteriormente, la masa de maíz fue movida y colocada en una máquina con alimentador - laminador - conformador - horno (Rodotee Ecológica-100, Tecnomáiz-Gruma, Monterrey, N.L., México). Un tornillo de alimentación mueve la masa horizontalmente a un múltiple que la empuja a través de una ranura. La masa plástica es alimentada sobre un par de rodillos lisos, uno girando en el sentido contrario a las agujas del reloj y el otro en el sentido de las agujas del reloj. El espaciamiento entre los rodillos es ajustable y el espesor de la hoja de masa determina el peso del producto final y su diámetro.

Los discos planos de trozos de masa salen del rodillo frontal sobre una correa de descarga, la cual los alimenta directamente al horno. Un horno alimentado por gas natural es usado para hornear la masa laminada a tortillas. Éstas son horneadas a unas temperaturas que varían desde 300°C hasta 330°C en un horno de tres filas de paso múltiple en el cual el tiempo de residencia varía desde 20-40 segundos. Después de enfriar las tortillas (0,18 cm o 61-74 milipulgadas de espesor) a temperatura ambiente, fueron envasadas en bolsas de polietileno y selladas para su almacenaje.

Antes del amasado, la composición enzimática puede ser mezclada con una porción de la cantidad total de harina de maíz para formar la llamada premezcla para tortillas. Esta premezcla puede ser añadida al comienzo del mezclado de la masa en dosificaciones controladas por kilogramo de harina de maíz (Amano-90, 500 U/k y Hemicelulasa - Rhodia, 5000 U/k). El portador en la premezcla puede ser también un ingrediente diferente a la harina de maíz, tal como un agente contra el cuajado o una mezcla de aditivos que contiene ingredientes y aditivos convencionales. La masa elaborada con la formulación enzimática proporcionó los siguientes resultados:

Capacidad de trabajado

de la masa de maíz: **Tratamientos con formulación:**

Consistencia (firmeza) **1 > 2 > 4 = 3**

día 0	148 a 165
<i>Adhesividad (pegajosidad)</i>	4 = 3 > 2 = 1
día 0	0,4 a 0,6
<i>Contenido de humedad (%)</i>	4 = 3 = 2 = 1
día 0	58 a 59
<i>Aspereza superficial</i>	4 = 3 = 1 > 2
<i>Pérdida de humedad al hornear (%)</i>	4 = 3 > 1 > 2
día 0	17 a 20
<i>Hinchado al hornear (%)</i>	2 > 4 > 1 = 3
día 0	75 a 89

Los resultados a escala piloto de la elaboración de tortillas mostraron que la masa de maíz preparada con la adición de una composición enzimática fue menos firme y menos cohesiva después del amasado que la masa convencional con CMC y la de control. Un contenido de humedad similar entre tratamientos indicó una masa de maíz más adhesiva (pero no pegajosa) con la mezcla de enzimas en comparación con la masa con CMC convencional y la de control. El tratamiento enzimático (AM) de la masa de maíz (a un contenido de humedad constante) con un nivel en exceso de actividad de hemicelulasa resultó en una pérdida rápida de resistencia de la masa (menos cohesiva) y producción de una masa pegajosa y húmeda.

La adición de mezclas de enzimas actúa para aumentar el rendimiento de masa de maíz por kilogramo de harina de maíz, y la cantidad total de agua usada para elaborar una masa de consistencia standard (tipo regular) es menor que si no se emplearan aditivos. Una consistencia superior de la masa es proporcional a su viscosidad y a la resistencia cohesiva de la masa que mantiene el alimento viscoelástico bajo esfuerzo durante la elaboración de la tortilla.

Una composición de bajo contenido de humedad puede resultar en una masa de maíz trabajable (firme), cohesiva (viscosa) y no pegajosa necesaria para conformar discos planos a tortillas delgadas y enrollables con un potencial para reducir el costo energético del horneado.

Las harinas de maíz débiles tienden a dar unas masas pegajosas que cuelgan en el equipo con poca cohesividad para soportar su propio peso si deben formar una masa laminada y no romperse.

La textura de la masa de maíz es determinada por factores tales como variedad del maíz, textura del endospermo, condiciones de secado, así como la captación de agua y el grado de gelatinización del almidón durante las operaciones de cocción y molienda del maíz. Durante la cocción alcalina, unos cambios químicos y físicos, tales como gelatinización y remoción parcial del germen y pericarpio, ocurren en el grano de maíz. Durante la formación de la masa de maíz, la molienda rompe los gránulos de almidón gelatinizados e hinchados y distribuye el almidón hidratado y la proteína alrededor de la porción no gelatinizada del endospermo del maíz.

Por lo tanto un conocimiento de las características de la harina de maíz así como las interacciones entre sus componentes y otros ingredientes de la masa puede ser mejorado al entender sus propiedades críticas. Una evaluación de las propiedades fisicoquímicas y reológicas de los productos de maíz ha sido una herramienta valiosa para describir y predecir la calidad de las materias primas, los productos intermedios y los productos finales en los procesos. Unas pruebas objetivas que predicen mejor la calidad de elaboración de tortillas y bocadoillos de las harinas de masa de maíz estadounidenses y mexicanas son la distribución del tamaño de partícula, la captación de agua (rendimiento de masa), el color de pH y la viscosidad pico en amilógrafo.

Las diferencias observadas durante el proceso de horneado en las propiedades de la masa de maíz se manifestaron en el producto de tortilla mecanizada final (50 tortillas por minuto):

Textura de la tortilla de maíz: Tratamientos con formulación:

<i>Flexibilidad (cap. de enrollado)</i>	4 = 3 > 2 > 1
7 días	3 a 4,5
<i>Compresibilidad (%)</i>	4 = 3 > 2 > 1
7 días	8 a 12
<i>Contenido de humedad (%)</i>	4 = 3 = 2 = 1
7 días	46 a 47
<i>Espesor (milipulgadas)</i>	4 = 3 > 2 > 1
7 días	70 a 74

Las tortillas a escala piloto mostraron que por medio de la mezcla enzimática la capacidad de trabajado de las masas pudo ser mejorada, con la excepción de una superficie rugosa de la tortilla en comparación con el aditivo de CMC convencional (goma soluble en agua) usado en la producción mecanizada comercial (600 o 900 tortillas por minuto).

El nuevo aditivo enzimático (AM a 500 U/k o RP a 5000 U/k) imparte la propiedad de retardar la pérdida de flexibilidad y compresibilidad durante un tiempo de almacenaje de siete días. Así, las tortillas envasadas con aditivo antimicrobiano y almacenadas a temperatura ambiente en las cuales no se pierde humedad desde las mismas se endurecen o enrancian más lentamente debido a la mezcla de enzimas, la cual aumenta la vida flexible en almacenaje y la frescura de las tortillas almacenadas y también recalentadas.

La harina de maíz nixtamalizada usada en esta invención (marca regular) puede contener partículas gruesas, intermedias y finas. Las grandes son trozos de pericarpio

remanente, endospermo periférico y germen. Las partículas medianas y pequeñas son mayormente trozos de endospermo y germen. Así la distribución del tamaño de partícula y el contenido de humedad en la formulación afectan directamente no solamente las propiedades físicas y reológicas de la masa de maíz, sino también su capacidad de trabajado durante la elaboración de la tortilla. Un pericarpio de maíz puede contener un 50% de contenido de hemicelulosa y cuando es extraída, unos rendimientos desde 30 hasta 45% han sido reportados. Esta hemicelulosa de fibra de maíz, comúnmente llamada goma de fibra de maíz (en procesos de molienda en seco y húmedo) tiene nuevas propiedades funcionales como adhesivo, espesador, estabilizador y aditivo contra el enranciado en productos de trigo horneados.

Una hidrólisis parcial enzimática y ácida del pericarpio del maíz produjo fragmentos de oligosacáridos que convirtieron la fibra dietética insoluble en una fibra soluble que puede desarrollar una matriz de masa hidratada aumentada, durante el amasado mecánico, con mejor tolerancia al laminado y a la conformación de la masa en la elaboración mecanizada de tortillas. La cantidad efectiva de enzimas de degradación de hemicelulosa y celulosa es mutuamente dependiente de las actividades de una con respecto a la otra. Adicionalmente, los niveles pueden ser también dependientes de la fuente microbiana (hongo o bacteria) usada en los procesos industriales de producción y purificación de enzimas.

El aditivo de mezcla de enzimas de la presente invención tiene la propiedad de retardar la pérdida de flexibilidad que es promovida por el almacenaje bajo refrigeración y a temperaturas de congelación. Otro aditivo convencional usado en la masa de maíz tiene la capacidad de retardar el enranciado microbiano por hasta siete días de almacenaje de las tortillas.

Aunque la presente invención fue descrita anteriormente en conexión con diversas realizaciones preferidas, debe quedar expresamente entendido que esas realizaciones son

SA

solamente para ilustrar la invención, y no deben ser consideradas en un sentido limitativo. Después de leer esta descripción, aquéllos versados en el arte pensarán sin dificultad en unas modificaciones y sustituciones no sustanciales de materiales y técnicas equivalentes, y se considera que todas esas modificaciones y sustituciones caen dentro del verdadero alcance de las reivindicaciones anexas.

Referencias

Patente de EE.UU. 3.730.732 1973 Rubio M.J.

" 3.788.139 1974 Rubio M.J. y Leal V.M.

" 4.513.018 1985 Rubio M.J.

" 4.990.343 1991 Haarasilta et al.

" 5.698.245 - 1997 Tanaka et al.

" 6.066.356 2000 Van der Wouw et al.

Solicitud de Patente Mexicana 952.200, 1995 López-Munguía

Báez-Vásquez, M.A. y Schoefield, J.D. 1993. Efecto de mejora del pan de una endoxilanas de *Trichoderma longibrachiatum* en el proceso de elaboración de pan Chorleywood (CBP) (resumen), *Cereal Foods World*, 38:635.

Fischer, G.B. y Stone, B.A. 1986. Paredes celulares y sus componentes en la tecnología del grano de cereal. En: *Advances in Cereal Science and Technology*, Ed. Y. Pomeranz, AACC, St. Paul, MN, EE.UU., Vol. 8:207-295.

Iturbe-Chinas, F.A., Lucio-Aguerreber, R.M. y López-Munguía, A. 1996. Vida en Almacenaje de tortillas extendida con amilasas de hongos. *International Journal of Food Science and Technology*, 31:505-509.

Jeffries, T.W. 1996. Bioquímica y genética de las xilanasas microbianas. *Current Opinion in Biotech.* 7:337-342.

McCleary, B.V. 1992. Medición de endo-1,4- β -D-xilanasa, en: *Xylans and Xylanases*, Eds. J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Someren y A.G.J. Voragen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda, pp. 161-169.

Montemayor E. y Rubio M. 1983. Harina cocida alcalina: Tecnología y uso en productos de tortilla y bocadillos (resumen), *Cereal Foods World*, 28:577.

Ramírez, J.F. y Alvarez, M.M. 1995. Tratamiento Biodegradable de Aguas de Nixtamalización (Nejayote). Resumen en el Simposio de Biotecnología Ambiental de Keystone (*Journal of Cellular Biochemistry*), Silverstone, Col. EE.UU.

Sustain, 1997. Una Revisión de Experiencias en la Literatura y la Industria, En: Fortificación de la harina de masa de maíz con Hierro y/o otros Nutrientes, por: Bressani, R., Rooney, L.W. y Serna-Saldívar, S.O. USAID, Washington, D.C., Diciembre (165p).

Watson, S.A. 1987. Estructura y Composición, En: *Corn Chemistry and Technology*, Eds. S.A. Watson y P.E. Ramsted. AACCC, St. Paul, MN, EE.UU., pp:53-78.

Wong, K.K.T. y Saddler, J.N. 1992. Xilanasas de *Trichoderma*, sus propiedades y su aplicación, En: *Xylans and Xylanases*, Eds. J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Someren y A.G.J. Voragen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda, pp. 171-181.

REIVINDICACIONES

1. Un método para elaborar una masa de maíz que produce unas tortillas de maíz que tienen una estabilidad mejorada en almacenaje, que comprende combinar harina de maíz nixtamalizada y agua con una cantidad efectiva de un componente enzimático que contiene por lo menos una de hemicelulasa y celulasa, y mezclar la harina de maíz, el agua y el componente enzimático para formar una masa de maíz.

2. El método de la reivindicación 1, en el cual la cantidad efectiva es desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 5000 Unidades de dicho componente enzimático por kilogramo de harina de masa de maíz.

3. El método de la reivindicación 2, en el cual la actividad enzimática de dicho componente enzimático es expresada como actividad de enzima de producción de xilosa o azúcar reductor por kilogramo de harina de masa de maíz.

4. El método de la reivindicación 1, en el cual dicha masa de maíz es preparada manualmente.

5. El método de la reivindicación 1, en el cual dicha masa de maíz es preparada mecánicamente.

6. El método de la reivindicación 4, en el cual dicha masa comprende adicionalmente un aditivo antimicrobiano en una cantidad de aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 1% en peso.

7. El método de la reivindicación 6, en el cual dicho componente enzimático es incorporado como una premezcla de harina para tortillas que incluye harina de masa de maíz, aditivos y dichas enzimas.

8. El método de la reivindicación 5, en el cual dicha masa comprende adicionalmente un aditivo antimicrobiano en una cantidad de aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 1% en peso.

9. El método de la reivindicación 8, en el cual dicho componente enzimático es incorporado como una premezcla de harina para tortillas que incluye harina de masa de maíz, aditivos y dichas enzimas.

PA 507915

THE UNITED STATES OF AMERICA**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:****UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE****United States Patent and Trademark Office****January 07, 2002**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

APPLICATION NUMBER: 09/729,196 ✓

FILING DATE: December 05, 2000

**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**




H. PHILLIPS
Certifying Officer

59

12/05/00

10772 U.S. PTO

10514 U.S. PTO

09/729196

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL LETTER
(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))

Docket No.

To the Commissioner of Patents:

Transmitted herewith for filing is the patent application of:
Manuel J. RUBIO, Roberto CONTRERAS and Marco A. BAEZ,
entitled: CORN TORTILLAS WITH IMPROVED TEXTURE RETENTION USING
AN ENZYME BLEND IN NIXTAMALIZED CORN FLOUR

Enclosed are:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ☒ | 21 pages of specification. |
| ☐ | sheets of formal drawings. |
| ☒ | a newly-executed declaration of the Inventors. |
| ☐ | a copy of an executed declaration of the inventor from prior application Serial No. , filed . |
| ☐ | Incorporation by reference. The entire disclosure of the prior application, from which a copy of the oath or declaration is supplied as indicated in the preceding box, is considered as being part of the disclosure of the accompanying application and is hereby incorporated by reference therein. |
| ☐ | an assignment of the invention to , including assignment cover sheet. |
| ☐ | Information Disclosure Statement with Form PTO-1449. |
| ☐ | copies of the Information Disclosure Statement citations. |
| ☐ | preliminary amendment. |
| ☒ | return receipt postcard (MPEP 503), specifically itemized. |
| ☐ | a verified statement to establish small entity status under 37 CFR 1.9 and 1.27. |
| ☐ | applicant claim small entity status. |
| ☐ | a certified copy of the Priority Document. |
| ☒ | other: application data sheet. |

If a CONTINUING APPLICATION, check appropriate box and supply the requisite information.

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP)

of prior application No. , filed .

☒	Customer No. 000466.
☒	Correspondence address is: YOUNG & THOMPSON, 745 South 23rd Street, Second Floor, Arlington, Virginia 22202.
☒	Telephone: (703) 521-2297. Telefax: (703) 685-0573 or (703) 979-4709.

09729196-120500

60

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL LETTER (continued)	Docket No.
---	------------

CLAIMS AS FILED

	NO. FILED	NO. EXTRA	RATE	FEE
BASIC FEE			\$ 710	\$ 710
TOTAL CLAIMS	9 - 20 =	0	x\$ 18	0
INDEPENDENT CLAIMS	1 - 3 =	0	x\$ 80	0
MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENT			\$ 270	
TOTAL				\$ 710
If applicant has small entity status under 37 CFR 1.9 and 1.27, then divide total fee by 2, and enter amount here. SMALL ENTITY -TOTAL				\$

☒	A check in the amount of \$710 to cover the filing fee is enclosed.
☒	The Commissioner is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayments to Deposit Account No. 25-0120 in the name of Young & Thompson, as described below. A duplicate copy of this sheet is enclosed.
☐	Charge the amount of \$ as filing fee.
☒	Credit any overpayment.
☒	Charge any additional fee required under 37 CFR 1.16 and 1.17, during the pendency of this application.
☐	Charge the issue fee set in 37 CFR 1.18 at the mailing of the Notice of Allowance.


 Andrew J. Patch
 Registration No. 32,825
 745 South 23rd Street
 Arlington, VA 22202
 Telephone 703/521-2287

December 5, 2000

09729196.120500

61

APPLICATION DATA SHEET

Inventor One Given Name:: MANUEL J.
Family Name:: RUBIO
Postal Address Line One:: 1621 COLLINS AVE.
City:: MIAMI BEACH
State or Province:: FLORIDA
Country of Residence:: UNITED STATES OF AMERICA
City of Residence:: MIAMI BEACH
State or Prov. of Residence:: FLORIDA
Country of Residence:: UNITED STATES OF AMERICA
Postal or Zip Code:: 33139
Citizenship Country:: UNITED STATES OF AMERICA

Inventor Two Given Name:: ROBERTO
Family Name:: CONTRERAS
Postal Address Line One:: R. CORTINES 2002 OTE.
City:: GUADALUPE, N.L.
Country:: MEXICO
City of Residence:: GUADALUPE, N.L.
Country of Residence:: MEXICO
Citizenship Country:: MEXICO

Inventor Three Given Name:: MARCO A.
Family Name:: BAEZ
Postal Address Line One:: 2A. PRIVADA DE MORELOS 158-INT.8
City:: CENTRO. QUERETARO, QRO.
Country:: MEXICO
City of Residence:: CENTRO. QUERETARO, QRO.
Country of Residence:: MEXICO
Citizenship Country:: MEXICO

CORRESPONDENCE INFORMATION

Correspondence Customer Number:: 000466
Name Line One:: YOUNG & THOMPSON
Address Line One:: 745 SOUTH 23RD STREET
Address Line Two:: SECOND FLOOR
City:: ARLINGTON
State or Province:: VIRGINIA
Country:: U.S.A.
Postal or Zip Code:: 22202
Telephone:: 703-521-2297
Fax One:: 703-685-0573
Fax Two:: 703-979-4709

APPLICATION INFORMATION

Title Line One:: CORN TORTILLAS WITH IMPROVED TEXTURE
Title Line Two:: RETENTION USING AN ENZYME BLEND IN
Title Line Three:: NIXTAMALIZED CORN FLOUR
Application Type:: UTILITY

REPRESENTATIVE INFORMATION

Representative Customer Number:: 000466

09729196-120500

**CORN TORTILLAS WITH IMPROVED TEXTURE RETENTION
USING AN ENZYME BLEND IN NIXTAMALIZED CORN FLOUR**

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

This invention relates to a method for improving the rheological properties of a corn masa dough, and improving the texture retention of corn tortillas produced therefrom.

2. Description of Related Art

High-quality masa flour can be produced by conventional techniques only if the food-grade dent corn has the following characteristics: uniformity in kernel size and hardness, low stress-cracks and kernel damage and ease of pericarp removal during the lime-water cooking process. Nixtamalized corn flour (NCF) is produced by alkaline cooking of corn, washing, grinding the nixtamal and drying to give corn masa flour. This flour is sieved and blended for different product applications and it is usually supplemented with additives before packaging for commercial table tortilla and snack production. MASECA is the main brand of NCF in the US and Latin America, followed by Minasa, Agroinsa, Illinois Cereal Mills (Cargill) and Quaker Oats (Sustain, 1997). Although the pericarp is partially removed during the alkaline-cooking and washing process stages, there is still

097299196-1205009

15

20

fiber left from the corn kernel (US Patent 4,513,018: Montemayor & Rubio, 1983). Unlike whole wheat, in which soluble fiber amounts to 11% of the total fiber, the corn soluble fiber is negligible (1%).

5 According to Watson (1987), the corn pericarp makes up 5-6% of the kernel dry weight. It also contains 67% hemicellulose, 23% cellulose and 0.6% soluble-fiber. Primary cell walls from the aleurone and starchy endosperm (83% dry weight) consist predominantly of arabinoxylan, β -glucan and some cellulose. It is estimated that mainly insoluble fiber in the pericarp and endosperm make up 78% of the total dietary fiber (9.5% in the kernel dry-weight)..

Arabinoxylans are complex polymers (20,000-170,000 daltons) with a linear backbone of (1,4)- β -xylopiranosyl units to which substituents are attached through O2 and O3 atoms of the xylosil residues (mainly, α -L-arabinofuranosyl; Fincher and Stone, 1986). A high degree of arabinosylation will increase its water solubility and more than 20% of the water in wheat-flour dough is associated with arabinoxylans. This polymer is apparently linked to the cellulose skeleton in the corn cell wall by ester linkage cross-bonding through ferulic and diferulic acid.

20 Nixtamalized corn flour can contain from 7-9% of total dietary fiber and 6-8% mainly consists of insoluble fiber on a dry-weight basis (Sustain, 1997). Dietary fiber of the new generation can surpass the functional and sensory qualities of the standard dietary fibers (e.g., commercial

09729135-100500

source of wheat bran can be removed of its starch, gluten and phytic acid). Due to its new fiber structure and its capillary effect, the new fiber has good water binding capacity (twofold) and a positive effect on baked goods freshness (e.g., Vitacel-brand name).

Haarasilta et al. (US Pat. 4,990,343), Baez Vasquez and Schoefield (1993) and Tanaka et al. (US Pat. 5,698,245) have proposed that the use of endo and exo-hemicellulases causes decomposition of wheat insoluble fiber.

Fiber components of Corn Kernel Parts

Part	%Dry matter	Ined. Fiber	Hemicel- lulose	Cellulose	Lignin	Soluble fiber	Total Fiber	% Kernel fiber
Whole Kernel	100	9.5	4.7	3	0.2	0.1	9.5	100
Starchy Endo- sperm	80.9	1.0	-	-	-	0.5	1.5	12
Alcorno Endo- sperm	2.0	90.0	-	-	-	25.0	75.0	15
Germ	11.0	11.0	18	7	1.0	3.0	14.0	16
Pericarp (bran)	5.3	90.0	67	23	0.1	0.6	90.7	51
Tip cap	0.8	93.0	70	-	2.0	-	95.0	6

Source: Wilson, S.A. 1987, Structure and Composition, In *Corn Chemistry and Technology*.

Native cellulose and hemicellulose would render the dough non-homogeneous and affect the dough stretching capacity by preventing the formation of a gluten network (e.g., gliadin which provides elasticity and glutenin which effects viscosity). The enzyme treated bread product has an increased volume, more uniform grain structure, slower aging (retarded staling or retrogradation) and a reduction or replacement in baking additives. The benefit of using a xylanase instead of a traditional hemicellulase (pentosanase) preparation is that

09729196-120500

there are fewer side activities (e.g. α or β -amylase, β -xylosidase/glucosidase) in the xylanase product. A suitable level of enzymes results in a desirable dough softening without causing stickiness, thereby improving machinability.

5 Xylanolytic systems (Wong and Saddler, 1992) includes xylanases (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase, EC 3,2,1,8) and β -xylosidases (1,4- β -D-xylan xylohydrolase, EC 3,2,1,37), the former generally hydrolyze the xylan backbone (endo-type) whereas the latter hydrolyze xylo-oligomers (exo-type). Xylose is not usually the major product and it is typically produced after xylobiose and xylotriose (smallest oligomer). Nonspecific xylanases from *Trichoderma* spp may attack cellulose and carboxymethylcellulose. Xylanases are classified into two major families (F or 10 and G or 11) of glycosylhydrolases. F10 xylanases are larger, more complex and produce low DP oligosaccharides (less specific); F11 are more specific for xylan (Jeffries, 1996). Low molecular weight xylanases (269-809 amino acid residues) were from *B. Pumilus*, *B. Subtilis* and *C. Acetobutylicum* (Wong and Saddler, 20 1992).

The xylanases can be prepared microbiologically by means of fungi and bacteria: *A. Niger* had shown not only arabinose releasing xylanase activity but also a xylotriose one, *Trichoderma* spp xylanases had optimal activity conditions 25 between 45-65°C and pH 3.5-6.5, *Bacillus* spp had alkaline tolerant (up to pH 10) and extreme thermophilic xylanases; and

a *Thermotoga* sp (strain FJSS3-B1) xylanase had a temperature optimum of 105°C at pH 5.5 and a half-life of 90 min at 95°C.

In recent years there has been a growing interest in the use of xylanase enzymes in the paper, pulp (enhance beatability and binding ability), food and feed industries. The use of xylanases (with or without cellulase and pectinase) has been proposed for clarifying juices and wine, for extracting coffee, plant oils and "starch", for improving the nutritional properties of agricultural silage, for macerating plant cell walls, for producing food thickeners and for providing "textures to bakery products". The scope for new applications is restricted mainly by the limited availability of specific xylanases with the required purity, properties (i.e., pH optima and thermal stability) and action patterns (endo or exo-hydrolytic mechanisms). Commercial xylanase preparations marketed for pulp treatment include Pulpzyme HA (with little cellulolytic activity) from *T. Reesei* and Albazyme from *T. Longibrachiatum*. Crude enzyme preparations containing both hemicellulases and cellulases could be used to improve fibrillation and drainage properties of recycled pulpwood fibers (Wong and Saddler, 1992).

To aid in these developments, simple, reliable and sensitive procedures are required for the quantitative measurement of xylanase in a range of products with trace to high enzyme activity levels. The advent of genetic engineering has allowed the production of very specific enzyme preparations. A range of plant polysaccharides, including

09729196-120500

starch, β -glucan, arabinoxylan, fructans, as well as starch damage can be measured (McCleary, 1992).

5 Lopez-Munguia et al. (Mexican patent application 952,200) describes an enzymatic process to produce corn tortillas which retard accelerated staling with texture improvement during four days frozen storage. A fungal α -amylase blend (i.e., commercial enzymes from Novo, Gist Brocades and Genencor International) was added during rehydration of Maseca corn flour (0.01 U/kg), and modified the starch during tortilla cooking up to the denaturing temperature (Iturbe-Chinas et al., 1996).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a method of improving the rheological properties of corn masa dough and the properties of tortillas produced therefrom, by adding to the nixtamalized corn flour an effective amount of an enzyme component (or blend) containing hemicellulase and/or cellulase. A dough prepared with this flour premix will have advantageous rheological and handling properties and tolerance in a mechanized tortilla machine (Rodotec Ecologica-100; made by Tecnomaz Gruma, Monterrey, N.L., Mexico). The final tortilla product will keep its flexibility and compressibility, even during extended commercial storage. The tortilla produced according to the invention therefore has less or no need of conventional antistaling additives.

20

25

The dough is produced by combining nixtamalized corn flour, water, and a hemicellulase and/or cellulase blend, with additives if desired, and mixing and kneading to form a suitable dough for a traditional as well as mechanized tortilla production. The invention also comprises a novel tortilla flour premix which includes corn masa flour, additives, and enzyme preparation with a suitable carrier directly incorporated to the flour during its production.

Accordingly, the present invention provides a soft and cohesive dough without causing stickiness during tortilla manufacture. Another object is to provide a table tortilla with improved flexibility and rollability during commercial storage. The main object of the invention is the application of an enzyme blend comprising commercial hemicellulase and/or cellulase to improve not only the rheological properties of corn masa dough but also the flexibility of table tortillas. The baked product or corn tortilla is made by combining nixtamalized corn flour with a suitable amount of an enzyme preparation, additives and water and mixing and kneading to produce a soft and cohesive dough without excessive stickiness during mechanized tortilla production.

Preferably, the enzyme blend contains between 500 and about 5,000 Units of a commercial hemicellulase or about 500 to about 5,000 Units of cellulase per kilogram of corn flour. The tortilla flour premix preferably includes commercial antimicrobial additives (0.5-1% by weight) in combination with

per minute at pH 4.7 and 40°C. (Fraction A: test result 1,400 micromoles-xylose/min-g). The major advantages of this procedure are that the color response with oligosaccharides of increasing degree of polymerization is stoichiometric; and the assay is very sensitive (10-50 µg).

Rhodia-Rhone Poulenc reported a minimum xylanase activity (multicomponent hemicellulase) of 4,000 U/gram (4,000 mg-maltose/min-g) or reducing sugar equivalent to 5,850 µmoles-glucose/min-g (DNS assay).

Hemicellulase activity (Amano-Enzyme USA Co., Ltd.). A Somogyi-Nelson assay was used and one unit is the amount of enzyme which produces reducing sugar equivalent to ten micrograms of xylose per minute at pH 4.5 and 40°C (Amano-90; test result 109,000 U/gram or 7,270 micromoles-xylose/min-g).

The enzyme preparation may contain xylanase activity functioning both with endo- and exo- mechanisms. They may also contain the following enzyme side-activities: (α-amylase (Amano-90), β-xylosidase (Amano-90) and β-glucosidase (Fraction A and Amano-90)).

Example 1

Preparation of a traditional-style corn tortilla, showing the effect of the enzyme blend on tortilla texture

A shelf-life study was designed with laboratory corn tortillas stored at room temperature and their flexibility and compressibility changes were recorded, simulating seven days storage.

Commercial enzymes were used (Amano-90:code AM-blend from A. Niger, and Rhodia-Rhone Poulenc code RP-blend) as well as a crude cellulase extract from *Trichoderma longibrachiatum* (Fraction A: code A-blend from Biotechnology Center-ITESM).
5 Three enzyme formulations in corn flour were tested: formulation 1 (0 U/k or control), formulation 2 (500 U/k) and formulation 3 (5000 U/k).

All treatments used nixtamalized corn flour (commercially available type) and a fine dough (corn masa) was manually prepared by rehydration of flour with warm water (30°C) in a 1:1.25 ratio, and adding a liquid antimicrobial additive (1% based on flour; Kemin brand). In experiments including enzymes, the appropriate enzyme activity of flour was dissolved in the warm water with additive and manually kneaded during one minute. The dough temperature was about 28°C and doughballs were manually divided and weighed (25 grams each). Doughballs were plated flat with a manual tortilla machine (Productos Practicos, S.A.) for controlling disk thickness around 0.2-0.3 cm (80-125 mils). Flat dough disks were cooked on a hot plate (185°C) and after 15 s the tortilla is turned to cook the other face. The exposed side heats up after another 15 s and finally the tortilla is turned again during 15 s until the vapor produced makes it swell. After cooling the tortillas (0.2 cm or 80 mils thick) at room temperature they were
20 packaged in polyethylene bags and sealed for storage.
25

To evaluate the flexibility effect of all the treatments, tortillas were reheated on a hot plate for 20 s and

005421-124500

cooled for five minutes before texture analysis. The flexibility measurement used stainless-steel rods of several diameters (0.5 to 3 cm) and rolling the warmed tortilla in a decreasing size order, recording the rod number at which the tortilla sample just breaks when it is flexed (US Patent 3,730,732). A more flexible tortilla will just break when it is bent around a smaller rod diameter than a less flexible one. A compressibility test used a procedure which measured the relative distance when compressing three stored tortillas with a standard weight. This compression test is an uniaxial deformation of a solid food under a constant force and it estimates an instantaneous elastic tortilla deformation. An indirect rollability test consisted of rolling the warmed tortilla as a cylinder and then recording its average diameter with a Vernier without breaking the warmed tortilla.

The laboratory results of enzymatic treatments were as follows:

Corn tortilla texture: Formula (3=5,000,2=500,1=0 U/k):

Flexibility

1-day	3 > 2 > 1
7-days	3 > 2 > 1

Compressibility (elasticity)

1-day	3 > 2 > 1
6-days	3 > 2 > 1

Rollability After 6-days 1 > 3 = 2

Moisture content (%) 7-days 3 = 2 > 1

The tortilla treatments to which a high dosage of the enzyme blend (AM and RP & 5000 U/k) has been added were

09729195-120500

excellent in the standard laboratory evaluations in comparison with the control and enzyme A treatments. A low enzyme and specific activity in the crude extract A-blend, as compared to the commercial enzymes, might have caused a low effect during tortilla storage.

Due to the addition of commercial enzymes during hydration of nixtamalized corn flour and dough kneading, flexibility, compressibility and rollability of the tortillas were improved. The activities of the arabinoxylan-depolymerizing enzymes (hemicellulases) of insoluble corn-pericarp can be relatively low; nevertheless, they are believed to have a favorable impact on the tortillas due to rendering them more soluble - with higher water binding capacity - and a tendency to be softer (less elastic than the control tortilla).

The traditional-style tortilla is usually produced without additional use of emulsifiers and gums, and therefore usually has a limited shelf-life because of microbial spoilage and staling. It is believed that hardening or loss of flexibility (35% after 4 days at room temperature), is caused by starch retrogradation. The addition of edible water soluble alkaline materials (1%) to the corn dough markedly increased the yield of dough (2.29) and tortilla (1.81) per kilogram of limed corn flour (U.S. Patent 3,730,732).

Thus a soluble corn-pericarp may impart not only water binding capacity, but also cohesivity and plasticity to corn dough for traditional tortilla making. A corn masa dough

model can be described as a plastic, cohesive, smooth mixture of large pieces of endosperm bound by a colloidal dispersion (5-9% of total dough). This glue-like dispersion is made of soluble starch, protein and non-starch polysaccharides which form a hydrated matrix where endosperm particles are suspended.

Example 2

Preparation of mechanized tortillas, showing the effect of the enzyme blend on corn dough and tortillas made therefrom.

A shelf-life test was performed on mechanized tortillas stored at room temperature, with standard laboratory evaluations made during their seven-day storage. Corn dough measurements before tortilla making included consistency (degree of resistance to penetration or firmness: Universal Penetrometer, Precision Scientific, Inc.) and adhesivity (ratio of adhesion breaking stress to cohesion breaking stress: U.S. Patent 3,788,139). Plastic doughs which are soft and adhesive can be measured, thus making possible to determine the adhesion when the cohesion is known. Tortilla texture tests during storage comprised flexibility (resistance to bending with a method used in U.S. Patent 3,730,732) and compressibility (resistance to compression with the same method as in Example 1). A higher flexibility index corresponds to rods of lower radii and indicates higher tortilla flexibility.

Mechanized tortilla pilot tests were carried out by adding to nixtamalized corn flour (commercially available type) a commercial water-soluble gum additive and two commercial

25

enzyme blends: Formulation 1 (Control), Formulation 2 (Carboxymethylcellulose Sodium-Amtex, 2500 ppm), Formulation 3 (Amano-90, 500 U/k as recommended) and Formulation 4 (Hemicellulase-Rhodia, 5000 U/k).

5 The corn dough was mechanically made as follows: the corn masa flour and dry additives were mixed for 5 minutes (Dough mixer, tecnomaiz-Gruma), warm potable water was added (1.2:1 ratio at 30°C) with an antimicrobial additive (0.8% Kemin, based on flour) and the resulting corn dough was kneaded for 5 minutes.

Thereafter, the corn dough was moved and placed in a feeder-sheeting-former-oven machine (Rodotee Ecologica-100, Tecnomaiz-Grauma, Monterrey, N.L. Mexico). A feed screw moves the dough horizontally into a manifold which pushes it through a slot. The plastic dough is fed onto a pair of smooth rollers, one rotating counterclockwise and the other clockwise. The gap between the rollers is adjustable and the thickness of the dough sheet determines the final product weight and its diameter.

20 The flat disks of dough pieces leave the front roller on a discharge belt, which feeds directly into the oven. A natural gas-fired oven is used to bake sheeted dough into tortillas. They are baked at temperatures ranging from 300°C to 330°C in a multiple-pass three-tier oven in which the residence time varies from 20-40 seconds. After cooling the
25 tortillas (0.18 cm or 61-74 mils-thickness) at room tempera-

09729196-180500

ture, they were packaged in polyethylene bags and sealed for storage.

Prior to kneading, the enzyme composition can be mixed with a portion of the total amount of corn flour to form a so-called tortilla pre-mixture. This pre-mixture can be added at the beginning of dough mixing in controlled dosages per kilogram of corn flour (Amano-90, 500 U/k and Hemicellulase-Rhodia, 5000 U/k). The carrier in the pre-mixture can also be other ingredients than corn flour, such as an anticaking agent or an additive mixture containing ingredients and conventional additives. Dough made with enzyme formulation gave the following results:

<u>Corn dough machinability:</u>	<u>Formulation treatments:</u>
Consistency (firmness) 0-day	1 > 2 > 4 = 3 148 to 165
Adhesivity (stickiness) 0-day	4 = 3 > 2 = 1 0.4 to 0.6
Moisture content (%) 0-day	4 = 3 = 2 = 1 58 to 59
Surface roughness	4 = 3 = 1 > 2
Moisture baking loss (%) 0-day	4 = 3 > 1 > 2 17 to 20
Baking swelling (%) 0-day	2 > 4 > 1 = 3 75 to 89

Pilot-scale results from the tortilla making showed that the corn dough prepared with the addition of an enzyme composition was less firm and less cohesive after kneading than the conventional CMC and control dough. A similar moisture content among treatments indicated a more adhesive (but non-

sticky) corn dough with enzyme blend as compared to the commercial CMC and control. Enzyme (AM) treatment of corn dough (at a constant moisture content) with an excess level of hemicellulase activity resulted in a rapid loss of dough strength (less cohesive) and production of a wet, sticky dough mass.

5

The addition of enzyme blends acts to increase the yield of corn dough per kilogram of corn flour, and the total amount of water used to make a standard consistency dough (regular type) is lower than if the additives were not employed. A higher dough consistency is proportional to its viscosity and to cohesive dough strength which holds the viscoelastic food under stress during tortilla making.

A low moisture content composition may result in a machinable (firm), cohesive (viscous) and non-sticky corn dough needed to shape flat disks into thin and rollable tortillas with a potential in reducing energy baking cost. Weak corn flours tend to give sticky doughs that hang up in the equipment with little cohesivity with which to bear its own weight if it is to form a sheet dough and not to break apart.

20

Corn masa dough texture is determined by factors such as maize variety, endosperm texture, drying conditions, as well as the water uptake and degree of starch gelatinization during corn cooking and grinding operations. During alkali-cooking, chemical and physical changes, such as gelatinization and partial removal of the germ and pericarp, occur in the corn kernel. During the formation of corn dough, grinding disrupts

25

09729196-1#0500

the swollen gelatinized starch granules and distributes the hydrated starch and protein around the ungelatinized portion of the corn endosperm.

5 Therefore a knowledge of corn flour characteristics as well as interactions among their components and other dough ingredients can be improved by understanding their critical properties. An evaluation of physicochemical and rheological properties of corn products has been a valuable tool for describing and predicting the quality of raw materials, intermediate and final products in processes. Objective tests which best predict the tortilla and snack making quality of U.S. and Mexican corn masa flours were particle size distribution, water uptake (dough yield), pH color and amylograph peak viscosity.

Differences observed during the baking process in the corn dough properties manifested themselves in the final mechanized tortilla product (50 tortillas per minute):

<u>Corn tortilla texture:</u>		<u>Formulation treatments:</u>
Flexibility (rollability)		4 = 3 > 2 > 1
	7-days	3 to 4.5
Compressibility (%)		4 = 3 > 2 > 1
	7-days	8 to 12
Moisture content (%)		4 = 3 = 2 = 1
	7-days	46 to 47
Thickness (mils)		4 = 3 > 2 > 1
	7-days	70 to 74

The pilot-scale tortillas showed that by means of the enzyme blend the machinability of the doughs could be improved with the exception of a rough tortilla surface as compared to

the conventional CMC additive (water-soluble gum) used in commercial mechanized production (600 or 900 tortillas per minute).

5 The new enzyme additive (AM at 500 U/k or RP at 5000 U/k) imparts the property of retarding the loss of flexibility and compressibility during a seven-day storage time. Thus, packaged tortillas with antimicrobial additive and stored at room temperature in which no moisture is lost from them become hard or stale more slowly because of the enzyme blend, which increases the flexible shelf-life and the freshness of stored and also reheated tortillas.

09729196-180500
20 The nixtamalized corn flour used in this invention (regular brand) can contain coarse, intermediate and fine particles. The large ones are pieces of remnant pericarp, peripheral endosperm and germ. The medium and small particles are mostly endosperm and germ pieces. Thus, particle size distribution and moisture content in the formulation affect directly not only the physical-rheological properties of corn dough but also its machinability during tortilla making. A corn pericarp may contain a 50% hemicellulose content and when it is extracted, yields from 30 to 45% have been reported. This corn-fiber hemicellulose, commonly referred to as corn fiber gum (in dry and wet milling processes) has new functional properties as an adhesive, thickener, stabilizer and antistaling
25 additive in baked wheat products.

A partial enzymatic and acidic hydrolysis of corn pericarp yielded oligosaccharide fragments rendering the

insoluble dietary fiber into a soluble fiber which may develop an increased hydrated mass dough matrix, during mechanical kneading, with better tolerance to dough sheeting and forming in mechanized tortilla making. The effective amount of hemicellulose and cellulose degrading enzymes is mutually dependent on the activities of each other. Furthermore, the levels may also be dependent on the microbial source (fungal or bacterial) used in industrial enzyme production and purification processes.

The enzyme blend additive of the present invention has the property of retarding loss of flexibility which is promoted by storing under refrigeration and freezing temperatures. Another conventional additive used in the corn masa dough has the capacity to retard microbial spoilage up to seven-day tortilla storage.

While the present invention has been described above in connection with several preferred embodiments, it is to be expressly understood that those embodiments are solely for illustrating the invention, and are not to be construed in a limiting sense. After reading this disclosure, those skilled in this art will readily envision insubstantial modifications and substitutions of equivalent materials and techniques, and all such modifications and substitutions are considered to fall within the true scope of the appended claims.

09729196-180500

5

20

References

U.S. Patent 3,730,732 1973 Rubio M.J.
 " 3,788,139 1974 Rubio M.J. and Leal V.M.
 " 4,513,018 1985 Rubio M.J.
 " 4,990,343 1991 Haarasilta et al.
 " 5,698,245 1997 Tanaka et al.
 " 6,066,356 2000 Van der Wouw et al.

Mexican Patent Application 952,200, 1995 Lopez-Mungula

Baez-Vasquez, M.A. and Schoefield, J.D., 1993, Bread improving effect of an endo-xylanase of *Trichoderma longibrachiatum* in the Chorleywood bread making process (CBP) (abstr.), *Cereal Foods World*, 38:635.

Fincher, G.B. and Stone, B.A. 1986, Cells walls and their components in cereal grain technology. In: *Advances in Cereal Science and Technology*, Ed. Y. Pomeranz, AACC, St. Paul, MN. USA. Vol 8:207-295.

Iturbe-Chinas, F.A., Lucio-Aguerreber, R.M., and Lopez-Munguia, A. 1996. Shelf-life of tortilla extended with fungal amylases. *International Journal of Food Science and Technology*, 31:505-509.

Jeffries, T.W. 1996. Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Current Opinion in Biotech.* 7:337-342.

McCleary, B.V. 1992. Measurement of endo-1,4-β-D-Xylanase, in: *Xylans and Xylanases* Eds. J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Sonneren and A.G.J. Voragen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holland. pp: 161-169.

Montemayor E. and Rubio, M. 1983. Alkaline cooked flour: Technology and use in tortilla and snack products (abstr). *Cereal Foods World* 28:577.

Ramirez, J.F. and Alvarez, M.M. 1995. Biodegradative Treatment of Nixtamalization Waters (Nejayote). Abstract in Keystone Symposia of Environmental Biotechnology (Journal of Cellular Biochemistry), Silverstone, Col. USA.

Sustain, 1997. A Literature and Industry Experience Review, In: Fortification of corn masa flour with Iron and/or Other

Nutrients, By: Bressani, R., Rooney, L.W. and Serna-Saldivar, S.O. USAID, Washington, D.C. December (165p).

Watson, S.A. 1987, Structure and Composition, In: Corn Chemistry and Technology Eds. S.A. Watson and P.E. Ramsted. AACC, St. Paul, MN. USA, pp:53-78.

Wong, K.K.Y. and Saddler J.N. 1992. Trichoderma xylanases, their properties and application, In: Xylanases and Xylanases Eds. J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Sonneren and A.G.J. Voragen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holland. pp: 171-181.

09729196.120500

We claim:

1. A method of making a corn masa dough that produces corn tortillas having improved storage stability, comprising combining nixtamalized corn flour and water with an effective amount of an enzyme component containing at least one of hemicellulase and cellulase, and mixing the corn flour, water and enzyme component to form a corn masa dough.

2. The method of claim 1 wherein the effective amount is from about 500 to about 5000 Units of said enzyme component per kilogram of corn masa flour.

3. The method of claim 2 wherein enzyme activity of said enzyme component is expressed as activity of xylose or reducing sugar producing enzyme per kilogram of corn masa flour.

4. The method of claim 1, wherein said corn masa dough is prepared manually.

5. The method of claim 1, wherein said corn masa dough is prepared mechanically.

6. The method of claim 4 wherein said dough further comprises an antimicrobial additive in an amount of about 0.5% to about 1% by weight.

7. The method of claim 6 wherein said enzyme component is embodied as a tortilla flour premix including corn masa flour, additives, and said enzymes.

8. The method of claim 5 wherein said dough further comprises an antimicrobial additive in an amount of about 0.5% to about 1% by weight.

9. The method of claim 8 wherein said enzyme component is embodied as a tortilla flour premix including corn masa flour, additives, and said enzymes.

85

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

Corn masa dough texture and tortilla flexibility are improved by adding to the nixtamalized corn flour, an enzyme blend comprising commercial hemicellulase and/or cellulase. The enzyme preparation has a positive effect on dough texture and improvement in tortilla elasticity and ductility during commercial storage. The combination of the enzyme blend and the method for dough and tortilla preparation can enhance conventional additives to delay corn tortilla hardening during storage.

5

09729196-120500

COMBINED DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY

As a below named inventor, I hereby declare that

My residence, post office address and citizenship are as stated below next to my name.

I believe I am the original, first and sole inventor (if only one name is listed below) or an original, first and joint inventor (if plural names are listed below) of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought on the invention entitled:

"Corn Tortillas with Improved Texture Retention Using an Enzyme Blend in Nixtamalized Corn Flour"

the specification of which: *(check one)*

REGULAR OR DESIGN APPLICATION

- ☒ is attached hereto.
- ☐ was filed on _____ as application Serial No. _____ and was amended on _____ (if applicable).

PCT FILED APPLICATION ENTERING NATIONAL STAGE

- ☐ was described and claimed in International application No. _____ filed on _____ and as amended on _____ (if any).

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, §1.56.

PRIORITY CLAIM

I hereby claim foreign priority benefits under 35 USC 119 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

PRIOR FOREIGN APPLICATION(S)

Country	Application Number	Date of Filing (day, month, year)	Priority Claimed

(Complete this part only if this is a continuing application.)

I hereby claim the benefit under 35 USC 120 of any United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of 35 USC 112, I acknowledge the duty to disclose information which is material to patentability as defined in Title 37 Code of Federal Regulations §1.56 which became available between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

(Application Serial No.)

(Filing Date)

(Status—patented, pending, abandoned)

09729196-120506

31

POWER OF ATTORNEY

As a named inventor, I hereby appoint the registered patent attorneys represented by Customer No. 000466 to prosecute this application and transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith, including: Robert J. PATCH, Reg. No. 17,355, Andrew J. PATCH, Reg. No. 32,925, Robert F. HARGEST, Reg. No. 25,590, Benoit CASTEL, Reg. No. 35,041, Eric JENSEN, Reg. No. 37,855, Thomas W. PERKINS, Reg. No. 33,027, and Roland E. LONG, Jr., Reg. No. 41,949, c/o YOUNG & THOMPSON, Second Floor, 745 South 23rd Street, Arlington, Virginia 22202.

Address all telephone calls to Young & Thompson at 703/521-2297. Telefax: 703/685-0573.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

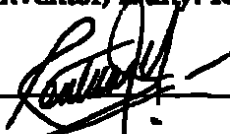
Full name of sole or first inventor: Manuel J. Rubio
(given name, family name)

Inventor's signature  Date Nov. 22, 2000

Residence: 1621 Collins Ave Miami Beach Fl. 33139 Citizenship: U.S.A.

Post Office Address: 1621 Collins Ave Miami Beach Fl. 33139

Full name of second joint inventor, if any: Roberto Contreras
(given name, family name)

Inventor's signature  Date Nov. 21, 2000

Residence: R. Cortines 2002 Ote. Guadalupe, N.L. México Citizenship: MEXICO

Post Office Address: R.Cortines 2002 Ote. Guadalupe, N.L. México

Full name of third joint inventor, if any: Marco A. Baez
(given name, family name)

Inventor's signature  Date Nov. 15, 2000

Residence: 2a. Privada de Morelos 158-int.8 Centro. Querétaro, Qro. Citizenship: MEXICO

Post Office Address: 2a. Privada de Morelos 158-int.8 Centro. Queretaro, Qro.

United States Patent & Trademark Office

Office of Initial Patent Examination

Application papers not suitable for publication

SN 09-729-196 Mail Date 12-05-00

- ☐ Non-English Specification
- ☒ Specification contains drawing(s) on page(s) _____ or table(s) 3
- ☐ Landscape orientation of text ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ Handwritten ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ More than one column ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ Improper line spacing ☐ Specification ☐ Claims ☐ Abstract
- ☐ Claims not on separate page(s)
- ☐ Abstract not on separate page(s)
- ☐ Improper paper size - Must be either A4 (21 cm x 29.7 cm) or 8-1/2"x 11"
 - ☐ Specification page(s) _____ ☐ Abstract
 - ☐ Drawing page(s) _____ ☐ Claim(s)
- ☐ Improper margins
 - ☐ Specification page(s) _____ ☐ Abstract
 - ☐ Drawing page(s) _____ ☐ Claim(s)
- ☐ Not reproducible

<u>Reason</u> ☐ Paper too thin ☐ Glossy pages ☐ Non-white background	<u>Section</u> ☐ Specification page(s) _____ ☐ Drawing page(s) _____ ☐ Abstract ☐ Claim(s)
--	--
- ☐ Drawing objection(s)
 - ☐ Missing lead lines, drawing(s) _____
 - ☐ Line quality is too light, drawing(s) _____
 - ☐ More than 1 drawing and not numbered correctly
 - ☐ Non-English text, drawing(s) _____
 - ☐ Excessive text, drawing(s) _____
 - ☐ Photographs capable of illustration, drawing(s) _____

09729196.120500

TRADUCCIÓN DEL INGLÉS AL ESPAÑOL de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No.09/729,196 relacionada con:

TORTILLAS DE MAÍZ CON RETENCIÓN MEJORADA DE TEXTURA QUE UTILIZAN UNA MEZCLA DE ENZIMAS EN HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADA

ANEXOS. La Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No.09/729,196 arriba mencionada, Declaración y Poder, Solicitud de Patente, Certificación del Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos de América.

LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Enero 07, 2002

ESTE PARA CERTIFICAR QUE ANEXO AL PRESENTE SE ENCUENTRA UNA FIEL COPIA TOMADA DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AQUELLOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE IDENTIFICADA ABAJO LA CUAL CUMPLE LOS REQUISITOS PARA CONCEDERLE UNA FECHA DE PRESENTACIÓN BAJO LA NORMA 35USC 111.

NUMERO DE SOLICITUD: 09/729,196
FECHA DE PRESENTACION: Diciembre 05, 2000

Por autorización del
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS
H. Phillips (Firmado)
H. PHILLIPS
Funcionario de Certificaciones

SELLO ADHERIDO

TORTILLAS DE MAÍZ CON RETENCIÓN MEJORADA DE TEXTURA QUE UTILIZAN UNA MEZCLA DE ENZIMAS EN HARINA DE MAÍZ NIXTAMALIZADA

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

Esta invención se relaciona con un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de maíz, y mejorar la retención de textura de tortillas de maíz producidas a partir de ella.

2. Descripción del Arte Relacionado

Una harina de masa de alta calidad puede producirse mediante técnicas convencionales únicamente si el maíz dentado de grado alimenticio tiene las siguientes características: uniformidad en el tamaño y la dureza del grano, pocas hendiduras de esfuerzo y poco daño del grano, y facilidad de remoción del pericarpio durante el proceso de cocción en agua de cal. La harina de maíz nixtamalizada es producida mediante cocción alcalina del maíz, lavado, molienda del nixtamal y secado para proporcionar una harina de masa de maíz. Esta harina es tamizada y mezclada para diferentes aplicaciones del producto y es usualmente suplementada con aditivos antes de ser envasada para la producción comercial de tortillas de mesa y bocadoillos. MASECA es la marca principal de harina de maíz nixtamalizada en US y Latinoamérica, seguida por Minisa, Agroinsa, Illinois Cereal Mills (Cargill) y Quaker Oats (Sustain, 1997). Aunque el pericarpio se remueve parcialmente durante las etapas de proceso de cocción alcalina y lavado, aún queda fibra proveniente del grano, de maíz (Patente US 4,513,018; Montemayor & Rubio, 1981). Una diferencia del trigo entero, donde la fibra soluble representa 11% de la fibra total, la fibra soluble del maíz es despreciable (1%).

De acuerdo con Watson (1987), el pericarpio del maíz representa 5 a 6% del peso seco del grano. También contiene 67% de hemicelulosa, 23% de celulosa y 0,6% de fibra soluble. Las paredes celulares primarias de la alcurona y el endospermo almidonado (83% de peso seco) consisten predominantemente en arabinoxilano, β -glucano y algo de celulosa. Se considera que la fibra principalmente insoluble en el pericarpio y endospermo representa 78% de la fibra dietética total (9,5% en el peso seco del grano).

Los arabinoxilanos son polímeros complejos (20 000 a 170 000 daltons) con una estructura de sopor-te lineal de unidades de (1,4)- β -xilopiranosilo a las cuales los sustituyentes se unen a través de átomos O2 y O3 de los residuos de xilosilo (principalmente, α -arabinofuranosil ; Fincher y Stone, 1986). Un alto grado de arabinosilación aumentará su

91 92
-3
6

solubilidad en agua y más de 20% del agua en la masa de harina de trigo está asociada con arabinoxilanos. Este polímero está aparentemente enlazado al esqueleto de celulosa en la pared celular del maíz por enlace transversal de éster a través de ácido ferúlico y diferúlico,

La harina de maíz nixtamalizada puede contener desde 7 a 9% de la fibra dietética total y 6-8% consiste principalmente en fibra insoluble en base al peso seco (Sustain, 1997). La fibra dietética de la nueva generación puede sobrepasar las cualidades funcionales y sensoriales de las fibras dietéticas estándares (por ejemplo, la fuente comercial de salvado de trigo puede ser librada de su almidón, gluten y ácido fitico). Debido a su nueva estructura de fibra y su efecto capilar, la nueva fibra tiene una buena capacidad de contención de agua (doble) y un efecto positivo sobre la frescura de los productos horneados (por ejemplo, la denominación comercial Vitacel).

Haarasilta y otros (Patente US 4,990.343), Báez Vázquez y Schoefield (1993) y Tanaka y otros (Patente US 5,698,245) han propuesto que el uso de endo y exohemicelulasas causa descomposición de la fibra insoluble de trigo.

Componentes de fibra de las partes del grano de maíz

Parte	% materia seca	Fibra insoluble	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	Fibra soluble	Fibra total	% fibra del grano
Grano entero	100	9,5	6,7	3	0,2	0,1	9,5	100
Endosperma almidonado	80,9	1,0	-	-	-	0,5	1,5	12
Endosperma de alcurona	2,0	50,0	-	-	-	25,0	75,0	15
Germen	11,0	11,0	18	7	1,0	3,0	14,0	16
Pericarpio (salvado)	5,3	90,0	67	23	0,1	0,6	90,7	51
Capa de extremidad	0,8	95,0	70	-	2,0	-	95,0	6

Fuente: Watson, S.A. 1987, Estructura y Composición, en *Corn Chemistry and Technology*

La celulosa y hemicelulosa naturales harían a la masa no homogénea y afectarían la capacidad de estiramiento de la masa, impidiendo la formación de una red de gluten (por ejemplo, gliadina que proporciona elasticidad y glutenina que afecta la viscosidad). El producto de pan tratado con enzimas tiene un volumen aumentado, una estructura de grano más uniforme, un envejecimiento más lento (enranciado o deterioro retardado) y una reducción o reemplazo en los aditivos de

92 43
-4
6

hornear. El beneficio de usar una xilanasa en vez de una preparación de hemicelulasa tradicional (pentosanasa) es que hay una menor cantidad de actividades secundarias (por ejemplo, α o β -amilasa, β -xilosidasa/glucosidasa) en el producto de xilanasa. Un nivel adecuado de enzimas da como resultado un reblandecimiento conveniente de la masa sin causar pegajosidad me orando de ese modo su capacidad de trabajado.

Los sistemas xilanolíticos (Wong y Saddler, 1992) incluyen xilanasas (1,4- β -D-xilan xilanohidrolasa, EC 3,2,1,8) y β -xilosidasas (1,4- β -D-xilan xilohidrolasa, EC 3,2,1,37), las primeras generalmente hidrolizan la estructura de soporte de xilano (tipo endo) mientras que las segundas hidrolizan los xilo-oligómeros (tipo exo). La xilosa no es usualmente el producto mayor y es típicamente producida después de la xiloblosa y la xilotriosa (el oligómero más pequeño). Unas xilanasas no específicas de *Trichoderma spp* pueden atacar la celulosa y carboximetilcelulosa. Las xilanasas son clasificadas en dos familias mayores (F o 10 y G u 11) de glicosilhidrolasas. Las xilanasas F10 son más grandes, más complejas y producen oligosacáridos de bajo DP (menos específicos); F11 son más específicas para xilano (Jeffries, 1996). Las xilanasas de bajo peso molecular (269-809 residuos de aminoácido) eran de *B.Pumilis*, *B. subtilis* y *C. acetobutilicum* (Wong y Saddler, 1992).

Las xilanasas pueden prepararse microbiológicamente mediante hongos y bacterias: *A.Niger* ha mostrado no solamente una actividad de xilanasa de liberación de arabinosa sino también una de xilotriosa, las xilanasas de *Trichoderma spp* tienen condiciones óptimas de actividad entre 45 a 65 °C y pH 3,5-6,5, *Bacillus spp* tiene unas xilanasas termofílicas extremas y tolerantes a alcalinidad (hasta pH 10) y una xilanasa de *Thermostoga sp* (cepa FjSS3-BI) tiene un óptimo de temperatura de 105 °C a pH 5,5 y una vida media de 90 minutos a 95 °C.

En años recientes ha habido un interés creciente en el uso de enzimas de xilanasa en las industrias del papel, pulpa (mejoran la capacidad de batido y la capacidad de adhesión), alimentos y alimentación. El uso de xilanasas (con o sin celulasa y pectinasa) se ha propuesto para clarificar jugos y vino, para extraer café, aceites vegetales y "almidón", para mejorar las propiedades nutritivas del ensilaje agrícola, para macerar paredes celulares de plantas, para producir espesantes de alimentos y para proporcionar "texturas a productos de panadería". El alcance para nuevas aplicaciones está restringido principalmente por la disponibilidad limitada de xilanasas específicas con la pureza, las propiedades (es decir, estabilidad térmica y óptimos de pH) y los patrones de acción (mecanismos endo o exohidrolíticos) requeridos. Las

preparaciones comerciales de xilanasa comercializadas para tratamiento de pulpa incluyen Pulpzyme HA (con poca actividad celulolítica) de *T. Reesei* y Albazyme de *T Longibrachiaum*.. Las preparaciones de enzimas crudas que contienen hemicelulasas y celulosas podrían ser usadas para mejorar las propiedades de fibrilación y drenaje de las fibras de madera de pulpa recicladas (Wong y Saddler, 1992).

Para ayudar en estos desarrollos, se requieren procedimientos simples, confiables y sensibles para la medición cuantitativa de xilanasa en un grupo de productos con niveles de actividad enzimática mínimos a elevados. El advenimiento de la ingeniería genética ha permitido la producción de preparaciones enzimáticas muy específicas. Un grupo de polisacáridos de plantas, incluyendo almidón, β -glucano, arabinoxilano, fructanos, así como deterioro de almidón, pueden medirse (McClary, 1992).

López-Munguía y otros (Solicitud de patente mexicana 952,200) describen un proceso enzimático para producir tortillas de maíz que retarda el enranciado acelerado con una mejora de la textura durante cuatro días de almacenamiento a congelación. Una mezcla de α -amilasas de hongos (es decir, enzimas comerciales de Novo, Gist Brocades y Genencor International) fue añadida durante la rehidratación de harina de maíz Maseca (0,01 U/kg), y modificó el almidón durante la cocción de la tortilla hasta la temperatura de desnaturalización (Iturbe-Chinas y otros, 1996).

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con un método para mejorar las propiedades reológicas de una masa de maíz y las propiedades de las tortillas producidas a partir de la misma, añadiendo a la harina de maíz nixtamalizada una cantidad efectiva de un componente (o mezcla) de enzimas que contiene hemicelulasa y/o celulasa. Una masa preparada con esta premezcla de harina tendrá unas propiedades reológicas y de manipulación ventajosas y tolerancia en una máquina de tortillas mecanizada (Rodotec Ecológica-100; fabricada por Tecnomáiz Gruma, Monterrey, N.L., México). El producto de tortilla final mantendrá su flexibilidad y compresibilidad, incluso durante un almacenamiento comercial prolongado. La tortilla producida de acuerdo con la invención tiene, por lo tanto, poca o ninguna necesidad de aditivos convencionales contra enranciado.

La masa se produce combinando harina de maíz nixtamalizada, agua y una mezcla de hemicelulasa y/o celulasa, con aditivos si se desea, y

mezclando y amasando para formar una masa adecuada para una producción de tortillas tanto tradicional como mecanizada. La invención también comprende una premezcla de harina para tortilla novedosa que incluye harina de masa de maíz, aditivos y una preparación enzimática con un portador adecuado incorporado directamente a la harina durante su producción.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una masa suave y cohesiva sin causar pegajosidad durante la elaboración de la tortilla. Otro objetivo es proporcionar una tortilla de mesa con flexibilidad y capacidad de enrollado mejoradas durante el almacenamiento comercial. El objetivo principal de la invención es la aplicación de una mezcla de enzimas que comprende hemicelulasa comercial y/o celulasa para mejorar no solamente las propiedades reológicas de la masa de maíz, sino también la flexibilidad de las tortillas de mesa. El producto horneado o tortilla de maíz es elaborado combinando harina de maíz nixtamalizada con una cantidad adecuada de una preparación enzimática, aditivos y agua y mezclando y amasando para producir una masa suave y cohesiva sin pegajosidad excesiva durante la producción mecanizada de tortillas.

Preferiblemente, la mezcla de enzimas contiene entre 500 y alrededor de 5 000 unidades de una hemicelulasa comercial o alrededor de 500 hasta alrededor de 5 000 unidades de celulasa por kilogramo de harina de maíz. La premezcla de harina para tortillas incluye preferiblemente unos aditivos antimicrobianos comerciales (0,5 a 1% en peso) en combinación con la mezcla de enzimas antes de añadir la premezcla directamente a la harina en la fábrica de producción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE MODALIDADES PREFERIDAS

Una tortilla puede definirse como un ponqué plano, redondo, no fermentado, producido a partir de maíz cocido con cal (*Zea Mays L.*). Tres tipos básicos de productos de maíz son elaborados industrialmente: tortillas de mesa, hojuelas de maíz y hojuelas de tortilla. Muchos fabricantes usan harina de masa de maíz debido a que no requiere mucha mano de obra o equipo, y los procesadores no tienen que pagar tanto para la eliminación de efluentes y el control de las prácticas de producción.

La mezcla de enzimas comprende alrededor de 500 a 5 000 unidades por kilogramo de harina de maíz, preferiblemente calculadas como unidades de xilanasa. Una preparación comercial de hemicelulasa de hongo de *A. Niger* fue proporcionada gentilmente por Amano Pharmaceutical Co. y otra hemicelulasa de componentes múltiples por Rhone-Poulenc (Rhodin). Una preparación de celulasa cruda de T

longibrachiatum (Fracción A; principalmente con actividades de endoxilanas y celulasa) fue obtenida de Biotechnology Center (ITESM, Monterrey, N.L., México; Báez Vásquez y Schoefield, 1991).

Las definiciones de las diferentes actividades enzimáticas son definidas a continuación:

Actividad de xilanas (Megazyme International Ireland, Ltd., Irlanda). Un ensayo de azúcar reductor Somogyi-Nelson modificado para la medición de α -xilanas usando α -D-rabinosilano de Trigo como sustrato (procedimientos de ensayo de Megazyme XYL 9/95:14-45). Una unidad es la cantidad de enzima que produce un micromol de xilosa por minuto a pH 4,7 y 40 °C. (Fracción A: resultado de prueba 1 400 micromoles de xilosa/ minutos-g Las mayores ventajas de este procedimiento son que la respuesta de color con oligosacáridos de grado creciente de polimerización es estequiométrica, y el ensayo es muy sensible (10 a 50 μ g).

Rhodia-Rhone Poulenc reportó una actividad de xilanas mínima (hemicelulasa de componentes múltiples) de 4.000 U/ gramo (4 000 mg de maltosa/ minuto-g) o azúcar reductor equivalente a 5 850 μ moles de glucosa/ minuto-g (ensayo DNS).

Actividad de hemicelulasa (Amano-Enzyme USA Co., Ltd.). Se usó un ensayo de Somogyi-Nelson y una unidad es la cantidad de enzima que produce azúcar reductor equivalente a diez microgramos de xilosa por minuto a pH 4,5 y 40°C (Amano-90; resultado de prueba 109 000 U/ gramo o 7,270 micromoles de xilosa/ minuto-g).

La preparación enzimática puede contener, actividad de xilanas que funciona con mecanismos tanto endo como exo. Puede también contener las siguientes actividades secundarias enzimáticas: α -amilasa (Amano-90), β -xilosidasa (Amano-90) y β -glucosidasa (Fracción A y Amano-90).

Ejemplo 1

Preparación de una tortilla de maíz al estilo tradicional, mostrando el efecto de la mezcla de enzimas sobre la textura de la tortilla

Un estudio de vida en almacenamiento fue diseado con tortillas de maíz de laboratorio almacenadas a temperatura ambiente, y sus cambios de flexibilidad y compresibilidad fueron registrados, simulando siete días de almacenamiento.

Se utilizaron enzimas comerciales (Amano-90- mezcla código AM de *A. Nlger* y Rhodia Rhone Poulenc: mezcla código RP) así como un extracto de celulasa cruda de *Trichoderma longibrachiatum* (Fracción A: mezcla código A de Biotechnology Center - ITESM). Se probaron tres formulaciones de enzimas en harina de maíz- formulación 1 (O U/k control), formulación 2 (500 U/k) y formulación 3 (5 000 U/k).

Todos los tratamientos usaron harina de maíz nixtamalizada (tipo disponible comercialmente) y una masa fina (masa de maíz) fue preparada manualmente por rehidratación de harina con agua tibia (30 °C) en una relación 1:1,25, y añadiendo un aditivo antimicrobiano líquido (1 % en base a la harina, marca Kemin). En los experimentos que incluyeron enzimas, la actividad enzimática apropiada de harina fue disuelta en el agua tibia con el aditivo y amasada manualmente durante un minuto. La temperatura de la masa era de alrededor de 28 °C y unas bolas de masa fueron divididas manualmente y pesadas (25 gramos cada una). Las bolas de masa fueron aplanadas con una máquina manual para tortillas (Productos Prácticos, S.A.) para controlar el espesor del disco en alrededor de 0,2 a 0,3 cm (80 a 125 milí pulgadas). Los discos planos de masa fueron cocinados en una plancha caliente (185 °C) y después de 15 segundos la tortilla se volteó para cocinar el otro lado. El lado expuesto se calentó después de otros 15 segundos y finalmente la tortilla fue volteada nuevamente durante 15 segundos hasta que el vapor producido la hizo hincharse. Después de enfriar las tortillas (0,2 cm u 80 milí pulgadas de espesor) a temperatura ambiente, fueron envasadas en bolsas de polietileno y selladas para su almacenamiento.

Para evaluar el efecto de todos los tratamientos sobre la flexibilidad, las tortillas fueron recalentadas sobre una plancha caliente por 20 segundos y enfriadas por cinco minutos antes de analizar su textura. La medición de flexibilidad usó unas varillas de acero inoxidable de varios diámetros (0,5 a 3 cm), enrollando la tortilla tibia en un orden decreciente de tamaños, y registrando el número de la varilla donde la muestra de tortilla simplemente se rompe cuando es flexionada (Patente US 3,730,732). Una tortilla más flexible sólo se romperá cuando sea doblada alrededor de un diámetro más pequeño de varilla en comparación con una tortilla menos flexible. Una prueba de compresibilidad usó un procedimiento que medía la distancia relativa cuando se comprimían tres tortillas almacenadas con un peso estándar. Esta prueba de compresión es una deformación axial en una dirección de un alimento sólido bajo una fuerza constante y estima una deformación elástica instantánea de la tortilla. Una prueba indirecta de capacidad de enrollado consistía en enrollar la tortilla tibia como un cilindro y entonces registrar su diámetro promedio con un Vernier sin romper la tortilla tibia.

Los resultados de laboratorio de los tratamientos enzimáticos fueron los siguientes:

Textura de tortilla de maíz. Fórmula (3=5,000, 2=500, 1=0 U/k):

Flexibilidad

1 día	3 > 2 > 1
7 días	3 > 2 > 1

Compresibilidad (elasticidad)

1 día	3 > 2 > 1
6 días	3 > 2 > 1

Capacidad de enrollado

Después de 6 días	1 > 3 = 2
-------------------	-----------

Contenido de humedad (%)

7 días	3 = 2 > 1
--------	-----------

Los tratamientos de las tortillas a los cuales se añadió una alta dosis de la mezcla de enzimas (AM y RP a 5 000 U/k) fueron excelentes en las evaluaciones estándares de laboratorio comparados con los tratamientos de control y enzima A. Una baja actividad enzimática y específica en la mezcla A de extracto crudo, en comparación con las enzimas comerciales, pudiera haber causado un bajo efecto durante el almacenamiento de la tortilla.

Debido a la adición de enzimas comerciales durante la hidratación de la harina de maíz nixtamalizada y el amasado de la masa, la flexibilidad, la compresibilidad y la capacidad de enrollado de las tortillas mejoraron. Las actividades de las enzimas de des polimerización de arabinosilano (hemicelulasas) del pericarpio de maíz insoluble pueden ser relativamente bajas; no obstante, se cree que tienen un impacto favorable en las tortillas debido a que las hacen más solubles (con capacidad superior de retención de agua) y una tendencia a ser más suaves (menos elásticas que la tortilla de control).

La tortilla al estilo tradicional se produce usualmente sin uso adicional de emulsores y gomas, y por lo tanto tiene usualmente una vida en almacenamiento limitada debido al deterioro microbiano y al enranciado. Se cree que el endurecimiento o pérdida de flexibilidad (35 % después de 4 días a temperatura ambiente) es causado por deterioro del almidón. La adición de materiales alcalinos comestibles solubles en agua.(1 %) a la masa de maíz aumenta notablemente el rendimiento de

masa (2,29) y tortilla (1, 81) por kilogramo de harina de maíz tratada con cal (Patente US 3,730,732).

Así, un pericarpio de maíz soluble puede impartir no solamente una capacidad de retención de agua, sino también capacidad de cohesión y plasticidad a la masa de maíz para la elaboración de tortillas tradicionales. Un modelo de masa de maíz puede ser descrito como una mezcla lisa, cohesiva y plástica de grandes trozos de endospermo ligados por una dispersión coloidal (5 a 9% de masa total). Esta dispersión similar a una cola es elaborada a partir de almidón soluble, proteína y polisacáridos diferentes al almidón que forman una matriz hidratada en la cual las partículas de endospermo están suspendidas.

Ejemplo 2

Preparación de tortillas mecanizadas, mostrando el efecto de la mezcla de enzimas sobre la masa de maíz y las tortillas elaboradas a partir de ellas

Una prueba de vida en almacenamiento fue realizada sobre tortillas mecanizadas almacenadas a temperatura ambiente, con evaluaciones de laboratorio estándares realizadas durante su almacenamiento de siete días. Las mediciones de la masa de maíz antes de la elaboración de la tortilla incluyeron consistencia (grado de resistencia a la penetración o firmeza: Penetrómetro Universal, Precision Scientific, Inc.) y adhesividad (relación de esfuerzo de ruptura de adhesión a esfuerzo de ruptura de cohesión: Patente US 3,788,139). Unas masas plásticas que son suaves y adhesivas pueden ser medidas, posibilitando así la determinación de la adhesión cuando la cohesión se conoce. Las pruebas de textura de la tortilla durante el almacenamiento comprendieron flexibilidad (resistencia al doblado con un método usado en la Patente US 3,730,732) y compresibilidad (resistencia a la compresión con el mismo método que en el Ejemplo 1). Un índice de flexibilidad superior corresponde a unas varillas de menores radios e indica una flexibilidad superior de las tortillas.

Las pruebas piloto sobre las tortillas mecanizadas fueron llevadas a cabo añadiendo a la harina de maíz nixtamalizada (tipo disponible en el comercio) un aditivo de goma soluble en agua comercial y dos mezclas de enzimas comerciales: Formulación 1 (Control), Formulación 2 (Carboximetilcelulosa Sodio - Amtex, 2 500 ppm), Formulación 3 (Amano-90, 500 U/k según recomendado) y Formulación 4 (Hemicelulasa - Rhodia, 5000 U/k).

La masa de maíz fue elaborada mecánicamente como sigue: la harina de masa de maíz y los aditivos secos se mezclaron por 5 minutos (mezcladora de masa, Tecnomatz Gruma), se añadió agua potable tibia (relación 1,2:1 a 30°C) con un aditivo antimicrobiano (0,8 % Kemin, con base en harina) y la masa de maíz resultante fue amasada por 5 minutos.

Posteriormente, la masa de maíz fue movida y colocada en una máquina con alimentador - laminador - conformador - horno (Rodotee Ecológica-100, Tecnomatz-Gruma, Monterrey, N.L., México). Un tornillo de alimentación mueve la masa horizontalmente a un múltiple que la empuja a través de una ranura. La masa plástica es alimentada sobre un par de rodillos lisos, uno girando en el sentido contrario a las agujas del reloj y el otro en el sentido de las agujas del reloj. El espacio entre los rodillos es ajustable y el espesor de la hoja de masa determina el peso del producto final y su diámetro.

Los discos planos de trozos de masa salen del rodillo frontal sobre una correa de descarga, la cual los alimenta directamente al horno. Un horno alimentado por gas natural es usado para hornear la masa laminada a tortillas. Éstas se hornean a temperaturas que varían desde 300 °C hasta 330 °C en un horno de tres filas de paso múltiple donde el tiempo de residencia varía desde 20 a 40 segundos. Después de enfriar las tortillas (0,18 cm o 61 a 74 mili pulgadas de espesor) a temperatura ambiente, se envasaron en bolsas de polietileno y se sellaron para su almacenamiento.

Antes de amasar, la composición enzimática puede mezclarse con una porción de la cantidad total de harina de maíz para formar la llamada premezcla para tortillas. Esta premezcla puede añadirse al inicio del mezclado de la masa en dosificaciones controladas por kilogramo de harina de maíz (Amano-90, 500 U/k y Hemicelulasa - Rhodia, 5000 U/k). El portador en la premezcla puede ser también un ingrediente diferente a la harina de maíz, tal como un agente contra el cuajado o una mezcla de aditivos que contiene ingredientes y aditivos convencionales. La masa elaborada con la formulación enzimática produjo los siguientes resultados:

Capacidad de trabajado de la masa de maíz:		Tratamientos de formulación:
Consistencia (firmeza)		1 > 2 > 4 = 3)
	día 0	148 a 165
Adhesividad (pegajosidad)		4 > 2 = 1
	día 0	0,4 a 0,6

Contenido de humedad (%)		$4 > 2 = 1$
	día 0	58 a 59
Aspereza superficial		$4 = 3 = 1 > 2$
Pérdida de Humedad al horneado (%)		$4 = 3 > 1 > 2$
	día 0	17 a 20
Hinchado al horneado		$2 > 4 > 1 = 3$
	día 0	75 a 89

Los resultados a escala piloto de la elaboración de tortillas mostraron que la masa de maíz preparada con la adición de una composición enzimática fue menos firme y menos cohesiva después del amasado que la masa convencional con CMC y de control. Un contenido de humedad similar entre tratamientos indicó una masa de maíz más adhesiva (pero no pegajosa) con la mezcla de enzimas en comparación con la masa con CMC convencional y la de control. El tratamiento enzimático (AM) de la masa de maíz (a un contenido de humedad constante) con un nivel en exceso de actividad de hemicelulasa resultó en una pérdida rápida de resistencia de la masa (menos cohesiva) y producción de una masa pegajosa y húmeda.

La adición de mezclas de enzimas actúa para aumentar el rendimiento de masa de maíz por kilogramo de harina de maíz, y la cantidad total de agua usada para elaborar una masa de consistencia estándar (tipo regular) es menor que si no se emplearan aditivos. Una consistencia superior de la masa es proporcional a su viscosidad y a la resistencia cohesiva de la masa que mantiene el alimento viscoelástico bajo esfuerzo durante la elaboración de la tortilla.

Una composición de bajo contenido de humedad puede resultar en una masa de maíz trabajable (firme), cohesiva (viscosa) y no pegajosa necesaria para conformar discos planos a tortillas delgadas y enrollables con un potencial para reducir el costo energético del horneado.

Las harinas de maíz débiles tienden a dar unas masas pegajosas que cuelgan en el equipo con poca cohesividad para soportar su propio peso si deben formar una masa laminada y no romperse.

La textura de la masa de maíz es determinada por factores tales como variedad del maíz, textura del endospermo, condiciones de secado, así como la captación de agua y el grado de gelatinización del almidón durante las operaciones de cocción y molienda del maíz. Durante la

cocción alcalina, unos cambios químicos y físicos, tales como gelatinización y remoción parcial del germen y pericarpio, ocurren en el grano de maíz. Durante la formación de la masa de maíz, la molienda rompe los gránulos de almidón gelatinizados e hinchados y distribuye el almidón hidratado y la proteína alrededor de la porción no gelatinizada del endospermo del maíz.

Consecuentemente un conocimiento de las características de la harina de maíz así como las interacciones entre sus componentes y otros ingredientes de la masa puede ser mejorado al entender sus propiedades críticas. Una evaluación de las propiedades fisicoquímicas y reológicas de los productos de maíz ha sido una herramienta valiosa para describir y predecir la calidad de las materias primas, los productos intermedios y los productos finales en los procesos. Pruebas objetivas que predicen mejor la calidad de elaboración de tortillas y bocadoillos de las harinas de masa de maíz estadounidenses y mexicanos son la distribución del tamaño de partícula, la captación de agua (rendimiento de masa), el color de pH y la viscosidad pico en amilógrafo.

Las diferencias observadas durante el proceso de horneado en las propiedades de la masa de maíz se manifestaron en el producto de tortilla mecanizada final (50 tortillas por minuto):

<u>Textura de la tortilla de maíz:</u>		<u>Tratamientos de formulación:</u>
Flexibilidad (capacidad de enrollado)		4 = 3 > 2 > 1
	7 días	3 a 4,5
Compresibilidad (%)		4 = 3 > 2 > 1
	7 días	8 a 12
Contenido de humedad		4 = 3 = 2 = 1
	7 días	46 a 47
Espesor (mili pulgadas)		4 = 3 > 2 > 1
	7 días	70 a 74

Las tortillas a escala piloto mostraron que por medio de la mezcla enzimática la capacidad de trabajado de las masas pudo ser mejorada, con la excepción de una superficie rugosa de la tortilla en comparación con el aditivo de CMC convencional (goma soluble en agua) usado en la producción mecanizada comercial (600 o 900 tortillas por minuto).

El nuevo aditivo enzimático (AM a 500 U/k o RP a 5000 U/k) imparte la propiedad de retardar la pérdida de flexibilidad y compresibilidad durante un tiempo de almacenamiento de siete días. Así, las tortillas envasadas con aditivo antimicrobiano y almacenadas a temperatura ambiente en las cuales no se pierde humedad desde las mismas se endurecen o enrancian más lentamente debido a la mezcla de enzimas, la cual aumenta la vida flexible en almacenamiento y la frescura de las tortillas almacenadas y también recalentadas.

La harina de maíz nixtamalizada utilizada en esta invención (marca regular) puede contener partículas gruesas, intermedias y finas. Las grandes son trozos de pericarpio remanente, endospermo periférico y germen. Las partículas medianas y pequeñas son mayormente trozos de endospermo y germen. Así la distribución del tamaño de partícula y el contenido de humedad en la formulación afectan directamente no solamente las propiedades físicas y reológicas de la masa de maíz, sino también su capacidad de trabajado durante la elaboración de la tortilla. Un pericarpio de maíz puede contener un 50% de contenido de hemicelulosa y cuando es extraída, unos rendimientos desde 30 hasta 45% han sido reportados. Esta hemicelulosa de fibra de maíz, comúnmente llamada goma de fibra de maíz (en procesos de molienda en seco y húmedo) tiene nuevas propiedades funcionales como adhesivo, espesante, estabilizador y aditivo contra el enranciado en productos de trigo horneados.

Una hidrólisis parcial enzimática y ácida del pericarpio del maíz produjo fragmentos de oligosacáridos que convirtieron la fibra dietética insoluble en una fibra soluble que puede desarrollar una matriz de masa hidratada aumentada, durante el amasado mecánico, con mejor tolerancia al laminado y a la conformación de la masa en la elaboración mecanizada de tortillas. La cantidad efectiva de enzimas de degradación de hemicelulosa y celulosa es mutuamente dependiente de las actividades de una con respecto a la otra. Adicionalmente, los niveles pueden ser también dependientes de la fuente microbiana (hongo o bacteria) usada en los procesos industriales de producción y purificación de enzimas.

El aditivo de mezcla de enzimas de la presente invención tiene la propiedad de retardar la pérdida de flexibilidad que es promovida por el almacenamiento bajo refrigeración y a temperaturas de congelación. Otro aditivo convencional usado en la masa de maíz tiene la capacidad de retardar el enranciado microbiano por hasta siete días de almacenamiento de las tortillas.

Aunque la presente invención se describió anteriormente en conexión con diversas modalidades preferidas, debe entenderse

expresamente que esas modalidades son únicamente para ilustrar la invención, y no deben ser consideradas en un sentido limitativo. Después de leer esta descripción, aquellos expertos en el arte pensarán sin dificultad en modificaciones y sustituciones no sustanciales de materiales y técnicas equivalentes, y se considera que todas esas modificaciones y sustituciones caen dentro del verdadero alcance de las reivindicaciones anexas.

Referencias

Patente US 3,730,732 1973 Rubio M.J

Patente US 3,788,139 1974 Rubio M.J. y Leal V.M

Patente US 4,513,018 1985 Rubio M.J.

Patente US 4,990,343 1991 Haarasilta y otros

Patente US 5,698,245 1997 Tanaka y otros

Patente US 6,066,356 2000 Van der Wouw y otros

Solicitud de Patente Mexicana 952.200, 1995 López-Mungula

Báez-Vásquez, M.A. y Schoefield, J.D. 1993. - Efecto de mejora del pan de una endoxilanas de *Trichoderma longibrachiatum* en el proceso de elaboración de pan Chorleywood (CBP) (Resumen), Mundo de Alimentos Cereales, 38:635.

Fischer, G.B. y Stone, B.A. 1986. Paredes celulares y sus componentes en la tecnología del grano de cereal. En: Avances en Ciencia y Tecnología de Cereales, Ed. Y. Pomeranz, AACC, St. Paul, MN, USA, Vol. 8:207-295.

Iturbe-Chinas, F.A., Lucio-Aguerreber, R.M. y López-Mungula, A. 1996. Vida en Almacenamiento de tortillas extendida con amilasas de hongos. Diario Internacional de Ciencia y Tecnología de Cereales, 31:505-509.

Jeffries, T.W. 1996. Bioquímica y genética de las xilanasas microbianas. Opinión Corriente en Biotecnología, 7:337-342.

McClary, B.V. 1992. Medición de endo-1,4-β-D-xilanas, en: Xilanos y Xilanasas, Eds. J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters van Someren y

A.G.J. Voragen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda, pp. 161-169.

Montemayor E. y Rubio M. 1981. Harina cocida alcalina: Tecnología y uso en productos de tortilla y bocadillos (resumen), Mundo de Alimentos Cereales, 28:577.

Ramírez, J.F. y Alvarez, M.M. 1995. Tratamiento Biodegradable de Aguas de Nixtamalización (Nejayote). Resumen en el Simposio de Biotecnología Ambiental de Keystone (Diario de Bioquímica Celular), Silverstone, Col. USA.

Sustain, 1997. Revisión de Experiencias en la Literatura y la Industria, En: Fortificación de la harina de masa de maíz con Hierro y/o otros Nutrientes, por: Bressani, R., Rooney, L.W. y Serna-Saldívar, S.O. USAID, Washinton, D.C., Diciembre (165p).

Watson, S.A. 1987. Estructura y Composición, En: Química y Tecnología del Maíz, Eds. S.A. Watson y P.E. Ramsted. AACC, St. Paul, MN, US., pp:53-78.

Wong, K.K.T. y Saddler, J.N. 1992. Xilanasas de *Trichoderma*, sus propiedades y su aplicación, En: *Xylatis alzd X)@latzases*, Eds. J. Visser, G. Beldman, M.A. Kusters-van Someren y A.G.J. Voragen. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Holanda, pp. 171-181.

REIVINDICACIONES

Reivindicamos:

1. Un método para elaborar una masa de maíz que produce unas tortillas de maíz que tienen una estabilidad mejorada en almacenamiento, que comprende combinar harina de maíz nixtamalizada y agua con una cantidad efectiva de un componente enzimático que contiene por lo menos una de hemicelulasa y celulasa, y mezclar la harina de maíz, el agua y el componente enzimático para formar una masa de maíz.
2. El método de la reivindicación 1, donde la cantidad efectiva es desde alrededor de 500 hasta alrededor de 5 000 unidades de dicho componente enzimático por kilogramo de harina de masa de maíz.
3. El método de la reivindicación 2, donde la actividad enzimática de dicho componente enzimático es expresada como actividad

de enzima de producción de xilosa o azúcar reductor por kilogramo de harina de masa de maíz.

4. El método de la reivindicación 1, donde dicha masa de maíz se prepara manualmente.

5. El método de la reivindicación 1, donde dicha masa de maíz se prepara mecánicamente.

6. El método de la reivindicación 4, donde dicha masa comprende adicionalmente un aditivo antimicrobiano en una cantidad de alrededor de 0,5% hasta alrededor de 1% en peso.

7. El método de la reivindicación 6, donde dicho componente enzimático es incorporado como una premezcla de harina para tortillas que incluye harina de masa de maíz, aditivos y dichas enzimas.

8. El método de la reivindicación 5, donde dicha masa comprende adicionalmente un aditivo antimicrobiano en una cantidad de alrededor de 0,5% hasta alrededor de 1% en peso.

9. El método de la reivindicación 8, donde dicho componente enzimático se incorpora como una premezcla de harina para tortillas que incluye harina de masa de maíz, aditivos y dichas enzimas.

EXTRACTO DE LA DIVULGACIÓN

La textura de la masa de maíz y la flexibilidad de la tortilla se mejoran agregando a la harina de maíz nixtamalizada una mezcla de enzimas que comprende hemicelulasa comercial y/o celulasa. La preparación de enzimas tiene un efecto positivo sobre la textura de la masa y mejora la elasticidad y ductilidad de la tortilla durante el almacenamiento comercial. La combinación de la mezcla de enzimas y el método para la preparación de la masa y la tortilla puede aumentar el efecto de los aditivos convencionales para retardar el endurecimiento de la tortilla de maíz durante el almacenamiento.

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA DEL DOCUMENTO ANEXO
TERMINADA ESTE 18 DE ENERO, 2001.