

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PRODUCCIÓN DE TRANSGLUTAMINASA EMPLEANDO *Streptomyces*
ladakanum EN TRES DIFERENTES SUSTRATOS EN UN MEDIO
FERMENTATIVO LÍQUIDO

TESIS


Que presenta IDALIA DOMÍNGUEZ MIGUEL

como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

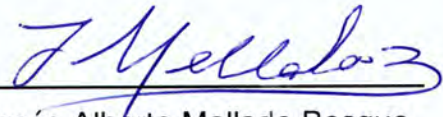
PRODUCCIÓN DE TRANSGLUTAMINASA EMPLEANDO *Streptomyces*
ladakanum EN TRES DIFERENTES SUSTRATOS EN UN MEDIO
FERMENTATIVO LÍQUIDO

TESIS

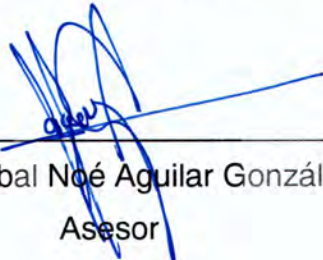
Elaborada por IDALIA DOMÍNGUEZ MIGUEL como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Producción Agropecuaria con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría.



Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó
Asesor Principal



Dr. Jesús Alberto Mellado Bosque
Asesor




Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Asesor



Dra. Xochitl Ruelas Chacón
Asesor



Dra. Dalia Ivette Carrillo Moreno
Jefe del Departamento de Postgrado



Dr. Antonio Flores Navega
Subdirector de Postgrado

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México, por proporcionar una beca para el desarrollo del presente proyecto, el cual hizo posible la culminación del mismo.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por facilitar el uso de sus instalaciones, sus equipos y al programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria.

Al Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó quien dirigió y me dio la oportunidad de llevar a cabo el presente proyecto.

A mis compañeros y amigos que aportaron sugerencias para el desarrollo y la culminación de este proyecto.

DEDICATORIA

*La culminación de este trabajo se la dedico a mi familia, y en especial a mi esposo **Lino Rangel** y a mi hijo **Roy Emmanuel** que han sido mi inspiración, y les agradezco por toda la paciencia y amor que me han tenido, los amo por siempre.*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE FIGURA ..	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Fermentación	5
2.1.1. Tipos de fermentaciones	6
2.1.1.1. Fermentación discontinua	6
2.1.1.2. Fermentación alimentada.....	6
2.1.1.3. Fermentación continúa.....	7
2.1.1.4. Fermentación sólida.....	7
2.1.1.5. Fermentación líquida.....	8
2.2. Enzimas	9
2.2.1. Clasificación de enzimas	10
2.2.2. Aplicaciones Industriales	11
2.2.3. Enzimas de origen microbiano	12
2.3. Reestructurados cárnicos.....	12
2.3.1. Sal	13
2.3.2. Fosfatos.....	13
2.3.3. Proteínas de soja.....	13
2.3.4. Enzima transglutaminasa	14
2.3.4.1. Características generales de la transglutaminasa.....	15
2.4. Transglutaminasa microbiana	16
2.4.1. Requisitos para la obtención de transglutaminasa	18
2.4.2. Medición de actividad enzimática	19

2.4.3.	Funciones	19
2.4.4.	Aplicaciones.....	20
2.4.4.1.	Carnes reconstituidas o reestructuradas.....	21
2.4.4.2.	Aplicación en lácteos	22
2.4.4.3.	Aplicación en pescado	23
III.	MATERIALES Y METODOS	25
3.1.	Lugar de estudio	25
3.2.	Reactivación de la cepa	25
3.2.1.	Cepa utilizada.....	25
3.2.1.1.	Material y equipo.....	26
3.2.1.2.	Reactivos	26
3.2.1.3.	Procedimiento	26
3.2.2.	Medio de crioconservación	27
3.2.2.1.	Material y equipo.....	27
3.2.2.2.	Reactivos	28
3.2.2.3.	Procedimiento	28
3.2.3.	Análisis cualitativo del extracto enzimático.....	28
3.2.3.1.	Material	28
3.2.3.2.	Procedimiento	29
3.3.	Conteo de células	29
3.3.1.	Material y equipo	30
3.3.2.	Reactivos.....	30
3.3.3.	Procedimiento.....	30
3.4.	Proceso de fermentación	32
3.4.1.	Materiales	32
3.4.2.	Equipo	32
3.4.3.	Reactivos.....	33
3.4.4.	Procedimiento.....	33
3.5.	Determinación de azúcares reductores.....	34
3.5.1.	Materiales y reactivos	34
3.5.2.	Preparación de reactivo de D.N.S.	34
3.5.3.	Procedimiento.....	34

3.5.4.	Curva estándar	35
3.5.5.	Determinación de azúcares totales.....	36
3.5.6.	Materiales y reactivos	36
3.5.7.	Preparación ácido sulfúrico con fenol	36
3.5.8.	Procedimiento.....	36
3.5.9.	Curva estándar	37
3.6.	Proteína por lowry	38
3.6.1.	Material y equipo	38
3.6.2.	Preparación de reactivos para medir proteína por el método de Lowry.....	38
3.6.3.	Procedimiento.....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1.	Análisis cualitativo de la enzima.....	41
4.2.	Fermentación	42
4.2.1.	Consumo de sustrato.....	42
4.3.	Azúcares reductores	44
4.4.	Azúcares totales.....	46
V.	CONCLUSIONES	48
VI.	REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura tridimensional de la transferasa	9
Figura 2. A) Estructura 3D de la Tgasa microbiana. B) Detalles de la triada catalizada	14
Figura 3. Lugar de estudio.....	21
Figura 4. Procedimiento para la reactivación de la cepa.....	23
Figura 5. Preparación del medio de crioconservación.....	24
Figura 6. Análisis cualitativo del extracto enzimático	25
Figura 7. Curva patrón de la escala de McFarland.....	28
Figura 8. Curva patrón de fructosa.....	32
Figura 9. Curva patrón de sacarosa	34
Figura 10. Curva patrón de la albúmina	38
Figura 11. Adherencia: a) carne de cerdo, b) pulpa negra	37
Figura 12. Consumo del glicerol.....	38
Figura 13. Consumo de glucosa.....	39
Figura 14. Consumo del almidón.....	40
Figura 15. Determinación de azúcares reductores por la técnica de D.N.S.	40
Figura 16. Determinación de azúcares reductores para el glicerol.....	41
Figura 17. Determinación de azúcares reductores para el almidón	42
Figura 18. Determinación de azúcares totales por la técnica de fenol sulfúrico en la glucosa.....	42
Figura 19. Determinación de azúcares totales para glicerol.....	43
Figura 20. Determinación de azúcares totales para almidón.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicación de MTGasa en el proceso de alimentos (Kieliszek y Misiewicz, 2013	¡Error! Marcador no definido.7
Tabla 2. Preparación del estándar de turbidez McFarland y absorbancias obtenidas	27
Tabla 3. Medio de cultivo para la fermentación.....	29
Tabla 4. Preparación de curva estándar de fructosa3¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 5. Preparación de curva estándar de sacarosa	33

RESUMEN

PRODUCCIÓN DE TRANSGLUTAMINASA EMPLEANDO *Streptomyces ladakanum* CON TRES DIFERENTES SUSTRATOS EN UN MEDIO FERMENTATIVO LÍQUIDO

Idalia Domínguez Miguel

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

El objetivo de esta investigación fue producir la enzima transglutaminasa empleando *Streptomyces ladakanum* por fermentación líquida, con diferentes sustratos. Se obtuvo la cepa, se procedió a la reactivación de la misma, posteriormente se realizaron pruebas cualitativas utilizando trozos de carne de cerdo y de res a las cuales se les aplicó extracto enzimático, después se llevó a cabo la cuantificación de células utilizando el método McFarland, se realizaron las fermentaciones con glucosa, almidón y glicerol, monitoreando cada 12 horas por 120 horas a 200, 300 y 400 rpm a 26 °C, obteniéndose una mayor producción de biomasa a 400 rpm en los medios que contenían glicerol como sustrato, el consumo de sustrato empezó a decaer a las 48 horas, se realizaron pruebas cuantitativas como azúcares totales y reductores y proteínas. Y en cuanto a la prueba cualitativa, la carne de cerdo presentó adherencia a las 8 horas en refrigeración a 4 °C posteriores a la aplicación del extracto enzimático. Para el análisis estadístico se empleó un diseño de cuadro latino, utilizando el paquete estadístico SAS 9.0.

Palabras clave: Enzima, fermentación, reestructurados cárnicos, transglutaminasa.

ABSTRACT

TRANSGLUTAMINASE PRODUCTION BY *Streptomyces Ladakanum* USING THREE SUBSTRATES IN SUBMERGED FERMENTATION

Idalia Domínguez Miguel

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó

The target of this project was to produce the enzyme transglutaminase using *Streptomyces ladakanum* by liquid fermentation with different substrates. The strain was obtained and reactivated, then qualitative tests were performed using pieces of pork and beef to which enzymatic extract was applied, then the cell quantification was carried out using the McFarland method, the fermentations were carried out with glucose, starch and glycerol, monitoring every 12 hours for 120 hours at 200, 300 and 400 rpm at 26 ° C, obtaining a higher production of biomass at 400 rpm in media containing glycerol as substrate, the consumption of substrate began to decay at 48 hours, quantitative tests as total sugars and reducers and proteins were carried out. As for the qualitative test, the pork presented adhesion at 8 hours in refrigeration at 4 ° C after the application of the enzymatic extract. For the statistical analysis, a latin box design was used, using the statistical package SAS 9.0.

Key words: Enzyme, fermentation, meat restructured, transglutaminase

I. INTRODUCCIÓN

Cada vez es mayor la demanda de productos variados de gran innovación que sean sanos, favorezcan la nutrición, inocuos y de excelente calidad. EL reto de la industria de alimentos es mejorar el aspecto, textura, color; en general, de las características organolépticas sin poner en riesgo la calidad nutrimental de los nuevos productos.

Las compañías de productos cárnicos reestructurados, moldeados, precocidos, tales como, jamón, mortadela, salchichas, chorizos y otros elaborados con cerdo, pollo, pavo, productos acuícolas y vacuno, presentan una buena demanda debido a su practicidad y fácil preparación.

Diferentes alternativas se han desarrollado para corregir la estabilidad de los que se comercializan en crudo, como la aplicación de sales, carragenina, celulosa y otros polímeros, sin embargo, la utilización de la enzima transglutaminasa mejora la estabilidad de los reconstituidos. (Márquez *et al.*, 2006).

Se han hecho estudios con la enzima transglutaminasa, y su efecto en algunos alimentos. Hoy en día esta enzima es de gran ayuda en la generación de tecnologías para la formulación y producción de alimentos a base de proteínas de origen animal, así como, vegetal. La principal aplicación de la transglutaminasa es como agente gelificante de alta estabilidad, a bajas temperatura (refrigeración), gelificación sin aplicación de cocción, mejora la textura y tiene funciones de espesante (Palafox y García, 2016).

La transglutaminasa microbiana (MTGase) de acuerdo con la comisión de numeración de enzimas (The Enzyme Commission Number) se clasifica como EC 2.3.2, transferasa conocida por modificar las propiedades funcionales de proteínas de los alimentos (Camolezi y Pedroso, 2014).

La transglutaminasa se produce en diversos organismos. Pero la mejor caracterizada es la que fue aislada de mamíferos. Para facilitar la producción en masa de esta enzima, se ha encontrado, purificado y caracterizado la transglutaminasa microbiana (Washizu *et al.*, 2014).

La transglutaminasa microbiana se ha producido por el género *Streptoverticillium*, el cual es no Ca^+ dependiente. *Streptomyces ladakanum*, es el mejor productor de la enzima (Aguilar *et al.*, 2012).

El tratamiento con la transglutaminasa microbiana (MTG) mejora la textura y la fuerza de gel de carne y proteínas en muchos productos formando un lazo entre la glutamina y lisina, que mejora la rigidez y elasticidad de gel de los productos cárnicos, evitando algunos atributos indeseables (Abdulatef *et al.*, 2007)

Debido al uso de la transglutaminasa en la reestructuración de productos cárnicos, ha sido objeto de estudio por varios años. Sin embargo, su producción es un proceso caro. Por esta razón en el presente proyecto se desea producir esta enzima que es de alta demanda para la industria de productos cárnicos reestructurados a partir de diferentes sustratos.

1.1. Objetivo general

Producir la enzima transglutaminasa empleando la cepa *Streptomyces ladakanum* en diferentes sustratos.

1.2. Objetivos específicos

- Obtención de la cepa *Streptomyces ladakanum* y reactivación de la misma.
- Realizar un análisis cualitativo de la enzima, utilizando diferentes tipos de carne.
- Seleccionar el mejor medio modelo para la producción de la enzima transglutaminasa.
- Determinar las condiciones de la producción de las enzimas transglutaminasa.
- Realizar análisis físico-químicos de la enzima.

1.3. Hipótesis

Es posible producir la enzima transglutaminasa a partir de la cepa *Streptomyces ladakanum* utilizando diferentes sustratos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Fermentación

La fermentación se define como un proceso catabólico oxidativo y el resultado es un compuesto orgánico degradado parcialmente. Los productos finales dependen del sustrato (Serrano, 2015).

La fermentación de alimentos surgió en diferentes épocas y culturas como un proceso empírico que se pasaba de generación en generación para la conservación de alimentos, dependiendo del tipo de alimento y técnica de fermentación se producen productos intermedios y/o finales de esta, cómo son ácidos orgánicos, álcalis, alcoholes, además se modifica el sabor de diferentes alimentos haciéndolos más agradables y de mejor aprovechamiento nutrimental (Shirai y Malpica, 2013).

Estos alimentos procesados por fermentación son parte importante de la dieta de una gran diversidad de grupos étnicos, ya que se le atribuyen propiedades benéficas para la salud, tales como actividad antioxidante, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antidiabética y antiaterosclerótica entre otras. Debido a estas propiedades del proceso de fermentación y los subproductos que se obtienen, han despertado el interés de científicos (Sanlier *et al.*, 2017).

2.1.1. Tipos de fermentaciones

2.1.1.1. Fermentación discontinua

Es también conocida como fermentación en batch o lote, es un sistema cerrado, en donde se adicionan los nutrientes y sustratos, posteriormente se inocula con el microorganismo de interés, se deja por un tiempo de incubación, bajo las mejores condiciones fisicoquímicas para el proceso de fermentación (Coronel, 2015).

La fermentación en lote es una tecnología ampliamente utilizada, ya que es de fácil operación, debido al proceso sencillo de adicionar el medio de cultivo, esterilizar y la sencillez del control de los parámetros, desde un principio se establece la composición del caldo de cultivo, pH, concentración de inóculo y las variables constantes de tiempo, agitación y concentración de oxígeno. Sin embargo, con este tipo de proceso las producciones han sido bajas con respecto al lote continuo alimentado, este último necesita de controlar los parámetros constantemente y de destreza para conseguir lotes constantes en la producción (Cruz, 2007).

2.1.1.2. Fermentación alimentada

En este tipo de fermentación los sustratos son añadidos poco a poco, de manera en que el proceso de fermentación va progresando. La formación de metabolitos secundarios se reduce por la alta concentración de glucosa en el medio, conocido

también como efecto glucosa, a esto se debe que en este tipo de fermentación se le añade en pequeñas concentraciones los nutrientes al principio del proceso continuando así hasta la fase final de la producción (Serrano, 2015).

2.1.1.3. Fermentación continúa

La fermentación continua consiste de un sistema abierto, es decir el caldo nutritivo estéril se adiciona constantemente al fermentador y una volumen igual de solución fermentada (biomasa y caldo fermentado) se retira al mismo tiempo del sistema. (Coronel, 2015).

2.1.1.4. Fermentación sólida

La fermentación en medio sólido se define como un bioproceso, en el cual se promueve el crecimiento de microorganismos en diferentes tipos de soporte, tanto inertes como orgánicos, los cuales son humedecidos con soluciones nutritivas y en el caso de los orgánicos participan como parte del sustrato, se pueden usar bacterias, hongos y levaduras. Una gran cantidad de investigaciones utilizan hongos filamentosos. El proceso de fermentación en medio sólido ordinariamente no es necesario adicionar agua si el sustrato contiene buena humedad y en algunos casos no es necesaria la inoculación de microorganismos ya que los autóctonos o nativos encuentran en el sustrato, ya

que estos tienen una gran diversidad de microorganismos heterogéneos, (Díaz, 2009).

La fermentación o cultivo en medio sólido se ha utilizado ampliamente para producir enzimas tales como la pectinasa, celulasas y lipasas. Además, tiene muchas ventajas sobre la fermentación sumergida, las cuales son que tiene mayor productividad, medios de bajo costo, mejor transferencia de oxígeno, tecnología simplificada, requisitos de energía y costo reducidos (Pliego *et al.*, 2016).

2.1.1.5. Fermentación líquida

También conocida como fermentación sumergida o cultivo sumergido consiste en el crecimiento de células de microorganismos en un reactor agitado que puede, al cual se le puede aplicar aireación por medios mecánicos. En escala laboratorio se suele usar en matraces en placas agitadoras. La mejora e implementación de este tipo de fermentación ha sido de gran importancia ya que ha facilitado el cultivo de microorganismos aeróbicos en condiciones de variables dependientes fijas, que promueven una densidad regular de biomasa, la que ha facilitado el estudio de la fisiología de los microorganismos (Vásquez, 2013).

En este tipo de proceso, se emplean diferentes formas mecánicas de aplicar la agitación para incrementar la transferencia de gases en cultivo de manera

homogénea e incrementar la biomasa en el cultivo, en principio permite la dispersión del gas en pequeñas burbujas, incrementando la interfase gas-líquido, además aumenta el tiempo de reacción del gas con el líquido y adicionalmente se disminuye el espesor de la capa de biomasa por efecto de la agitación, la cual rompe la “nata” de microorganismos formada (Vasquez, 2013).

2.2. Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de origen proteico, capaces de catalizar reacciones en sistemas biológicos y ambientes controlados, son de alta especificidad a velocidades de reacción muy extraordinarias (Rivera y García, 2007). Un catalizador es una sustancia que ayuda a que una reacción química ocurra de manera rápida (Molina, 2016).

Las enzimas ofrecen una gran gama de aplicaciones para la mejora de alimentos. Existen factores tales como el logro de rendimientos óptimos y la recuperación eficiente de la proteína que se desea usar son los principales elementos disuasivos en el uso de enzimas. Se continúan desarrollando enzimas nuevas y únicas con el propósito de producir ingredientes alimenticios por hidrólisis, síntesis o biocatálisis (James *et al.*, 2013).

Las enzimas cuentan con diferentes aplicaciones industriales, en el área de alimentos se emplean en producción de bebidas fermentadas, alimentos

fermentados, saborizantes y aromas para alimentos. (Grevechova y Prieto, 2006).

2.2.1. Clasificación de enzimas

Desde 1961, la unión Internacional de Bioquímica calificó a las enzimas en 6 grandes grupos:

- Oxidorreductasas: transferencia de electrones.
- Transferasas: transferencia de grupos radicales.
- Hidrolasas: hay una rotura de los enlaces, incorporándose así una molécula de agua.
- Liasas: realizan la rotura de enlaces covalentes por añadir o eliminar grupos.
- Isomerasas: se encargan de realizar reacciones de isomerización, es decir una transferencia de grupos dentro de la misma molécula.
- Ligasas: forman enlaces covalentes por reacciones de condensación (Merino y Noriega, 2015).

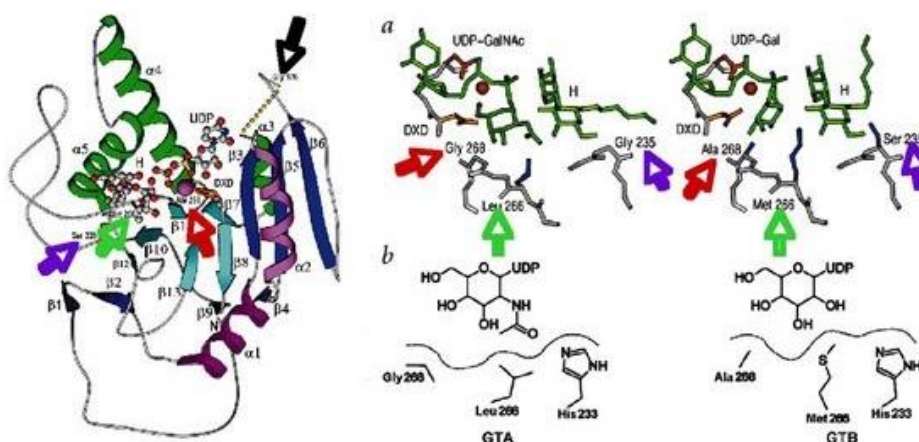


Figura 1. Estructura tridimensional de una transferasa

2.2.2. Aplicaciones Industriales

La aplicación de enzimas a nivel industrial no es desconocida, ya los procesos tradicionales que han surgido desde hace cientos de años. Las enzimas industriales se han utilizado para la mejora de los procesos, ayudando así a proporcionar el uso de nuevas materias primas o modificar las propiedades fisicoquímicas de una materia prima, con el afán de mejorar procesamiento. Las enzimas se han utilizado en industrias como licores, panadera, láctea, En mejorar el medio ambiente, de productos de limpieza, etc. Hoy en día gran parte de las enzimas son usadas en industrias en el procesamiento de alimentos. Otro uso que se le da a las enzimas es para perfeccionar un producto, dando mejores características organolépticas, o incrementando su vida de anaquel, con el fin de que el consumidor logre aceptarlo (Castellanos, et al., 2006).

2.2.3. Enzimas de origen microbiano

Los microorganismos son especialistas en degradar todos los sustratos, dependiendo de las condiciones y la evolución esto se ha visto favorecida por la capacidad de producir moléculas con actividad catalítica específica diseñadas para degradar diferentes sustratos, un eficaz proceso dentro y fuera de las células. Las proteasas que se obtienen de las bacterias son el principal grupo de enzimas de origen microbiano que más se utilizan (55%), después se encuentran las hidrolasas de hidratos de carbono (20%) bacterianas y fúngicas. (Segura y Navarrete, 2012).

Así mismo se encuentra la enzima transglutaminasa, que es considerablemente utilizada en la industria cárnica.

2.3. Reestructurados cárnicos

Los productos reestructurados de la carne puede ser una forma adicional de agregar valor a los productos cárnicos. Es un proceso por el cual varias partes de la carcasa y recortes se convierten mediante una manipulación mecánica en formas recién estructuradas (Al-sheddy *et al.*, 2015).

Una gran parte de los métodos usados para la reestructuración de carne o pastas de carne se centran la extracción de proteínas con sales, fosfatos y procesos mecánicos.

2.3.1. Sal

La sal además de ser importante en las carnes procesadas también cumple una función poderosa en las carnes reestructuradas. En los reestructurados que provienen de carne de res, la sal se ha asociado con la pérdida de color y la generación de la rancidez. Se ha querido sustituir el uso de la sal para el procesamiento de la carne, en los cuales se incluye la transglutaminasa, fibra dietética y caseinato. También el uso de sal y fosfatos en filetes reestructurados ha sido ampliamente estudiado (Sun, 2014).

2.3.2. Fosfatos

Los fosfatos son utilizados como mejoradores de la jugosidad y textura, protectores contra aparición de rancidez de grasas en productos cárnicos procesados. Así como la sal y el fosfato que son usados para la reestructuración de la carne, estos actúan de manera que se disminuya el agua en la operación de cocción, además incrementa la unión de trozos de carne (Salinas, 2007).

2.3.3. Proteínas de soja

Una gran variedad de proteínas como ingredientes funcionales en productos cárnicos reestructurados, de los cuales las proteínas de soja son de las más

utilizadas para este proceso. Estas proteínas funcionan como aglutinantes para mejorar el rendimiento y la textura del producto, como posible agente gelificante para optimar la duración de la emulsión al calentar, incrementar la absorción del agua y las propiedades de unión (Sun, 2014).

2.3.4. Enzima transglutaminasa

La enzima transglutaminasa tiene el nombre de proteína-glutamina: amina γ -glutamyltransferasa, también conocido con el nombre de factor XIII o fibrinoligasa. Esta numerado con EC 2.3.2.13. La transglutaminasa utiliza el grupo γ -carboxamida de restos de glutamina unidos a péptidos como donador de acilo, que tiene una amplia especificidad para sustratos aceptor (Nielsen, 2013).

Se encuentra de natural en el plasma sanguíneo, en hígado de mamíferos y en músculo de osteíctios, de forma industrial se produce por fermentación de microorganismos del género *Streptomyces* (Jozami y Seselovsky, 2003).

Se ha utilizado recientemente para el procesamiento de alimentos ya que ha demostrado que mejora el sabor, características organolépticas de varios alimentos a base de proteínas (Seswita, 2014).

La transglutaminasa se emplea en la industria alimentaria para reestructuración los enlaces de aminoácidos de proteínas de productos de carne, leche y pastas de pescados, por lo esto es apreciado como un excelente aditivo, esta enzima se ha obtenido del género *Streptomyces*, su ventaja es que no es calcio dependiente. Entre las variedades de este género el *Streptomyces ladakanum* es considerado el principal productor de esta enzima (Aguilar *et al.*, 2012).

Aunque la principal aplicación de la transglutaminasa permanece en el sector alimentario, nuevas aplicaciones han surgido durante la última década. Estas aplicaciones engloban las áreas de ingeniería biomédica, ciencia de materiales, textiles y procesamiento de piel (Zhang, 2013).

2.3.4.1. Características generales de la transglutaminasa

La transglutaminasa tiene la característica única de cambiar la función de las proteínas debido a entrecruzamientos de enlaces covalentes lo cual ha despertado gran interés por el desarrollo y producción de esta enzima. Este tipo de enzima cataliza la reacción de transferencia entre los grupos γ -carboxiamida de residuos de glutamina en proteínas, péptidos y en varias aminos primarias (Palafox y García, 2015).

La primera transglutaminasa caracterizada fue la TGasa microbiana producida por *Streptomyces mobaraensis*. Esta enzima es excretada como un zimógeno que es procesado por dos enzimas endógenas para producir la forma activa. Esta

especie del género de los actinomicetos son aerobias, gram positivas, alcohol no resistente y que además son capaces de formar un micelio ramificado y raramente segmentado. La característica de la TGasa es ser naturaleza extracelular y no dependiente del calcio (Aguilar *et al.*, 2012).

2.4. Transglutaminasa microbiana

La transglutaminasa bacteriana (MTG) se obtiene de *Streptoverticillium sp.* Esta enzima es liberada al medio de fermentación a partir la membrana citoplasmática como un zimógeno y es activada por un proceso proteolítico por lo que no requiere la destrucción de las células para su obtención (Vigo, 2014).

La MTG obtenida de *S. mobarensis* es una proteína compuesta por 331 aminoácidos. Esta enzima tiene forma de disco con una ranura lateral profunda que cuenta con residuos del aminoácido cisteína en la posición 64 tiene un grupo tiol libre, el cual es necesario para la actividad enzimática. Su masa molecular es de 37.9 KDa, que es aproximada a la masa molecular de la enzima de origen animal.

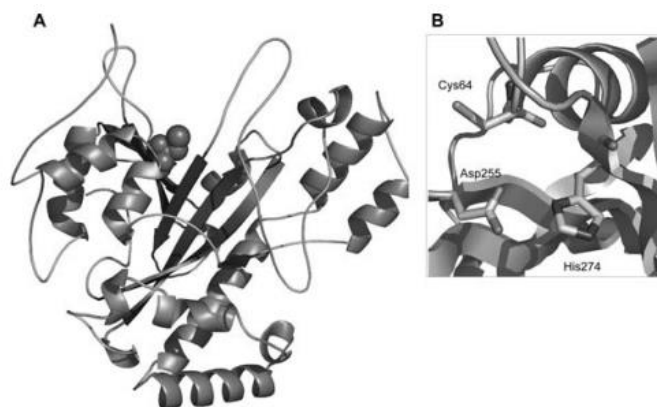


Figura 2. A) Estructura 3D de la TGasa microbiana. B) Detalles de la triada catalizada

Aunque su actividad enzimática se produce entre 5.0 y 8.0, esta enzima suele estar activa en pH de 4.0 a 9.0 (Góes y Bueno, 2014).

La transglutaminasa microbiana (MTG) es considerada como un aditivo eficiente en la unión de proteínas musculares para obtener productos reestructurados, aunque resulta de alto costo. El microorganismo *Streptomyces ladakanum* NRRL 3191 es el principal productor de transglutaminasa. Es una enzima de tipo extracelular y calcio independiente. Son estas propiedades las que hacen que este tipo de enzimas sean de gran interés para la industria de alimentos (Portilla *et al.*, 2009).

La MTG demostró que es capaz de realizar enlaces cruzados en la mayoría de las proteínas de los alimentos, tales como las caseínas, la globulina de la soja, el gluten, las actinas, la miosina y las proteínas del huevo, con la misma eficacia que la transglutaminasa derivada de mamíferos. Debido a las ventajas que esta enzima aporta a las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, su aplicación

se ha extendido en la industria del procesamiento de alimentos, en medicina y en cosméticos, lo que aumenta su demanda (Martins *et al.*, 2014).

El centro activo de esta enzima está compuesto de residuos de cisteína, histidina y asparagina. Trabaja con una temperatura de 40 °C y un pH de 5.5, las cuales resultan las más convenientes para su actividad catalítica (Kieliszek y Misiewicz, 2013).

2.4.1. Requirimientos para la obtención de transglutaminasa

El sistema de cultivo sumergido para la producción en batch, demanda aireación y agitación. Se lleva a cabo a temperaturas de 25-35 ° C y la enzima secretada por el microorganismo tarda de 2 a 4 días en alcanzar la máxima productividad. Los principales sustratos como fuente de carbono en el caldo de cultivo son: glucosa, sacarosa, almidón, glicerol y/o dextrina. Los compuestos nitrogenados pueden ser orgánicos e inorgánicos, incluyendo nitrato de amonio, sulfato de amonio, urea, nitrato de sodio, cloruro de amonio, soja, arroz, maíz, trigo, peptona, extracto de carne, caseína, aminoácidos y extractos de levadura. Los minerales y otros elementos necesarios para la fermentación son fósforo, magnesio, potasio, hierro, cobre, zinc, vitaminas. Posterior al cultivo, el caldo conteniendo a la enzima, por centrifugación para separar la biomasa, después de emplean diversos pasos de purificación. La concentración de enzima y purificación generalmente implican el uso de una secuencia de métodos que aumentan su eficacia. La enzima recuperada puede purificarse por precipitación con alcoholes, acetonas, cloruros, sales de sulfato de amonio, uso de

membranas, ultrafiltración y métodos cromatográficos de columnas iónicas y de absorción (De Góes-Favoni y Bueno, 2014).

2.4.2. Medicion de actividad enzimática

Se han desarrollado muchos métodos de ensayo para medir la actividad de TGasa. El ensayo más comúnmente utilizado es la formación de ácido L-glutámico γ -monohidroxamato esto mediante la incorporación de N-CBZ-Gln-Gly a la hidroxilamina. La actividad de la TGasa también se cuantifica midiendo la incorporación de aminas radiomarcadas en sustratos de glutaminilo tales como dimetilcaseína (Sokullu *et al.*, 2015).

2.4.3. Funciones

Algunas de las funciones que cumple la transglutaminasa son los siguientes:

- Capacidad de ligar: a través de enlaces covalentes catalizado por la transglutaminasa los cuales son muy fuertes. Reconstituida la carne, no se mantiene separa y permanece aún después de ser congelada o durante la cocción.
- Poder gelificante: provee firmeza al producto.
- Conservación de humedad.

- Propiedades de tonicidad a la carne.
- Estabilización de emulsiones.
- Mejora la viscosidad estabilizando la emulsión.
- Potencia la calidad nutricional de las proteínas: introducción aminoácidos requeridos, que no se encuentran de forma natural en músculo usando de la TG (Jozami y Seselovsky, 2003).

2.4.4. Aplicaciones

Las propiedades de la MTGasa, le dan características apropiadas para ser una materia prima de extensa aplicación en la industria del procesamiento de alimentos. Las características son:

- Amplio rango de pH, de 4.0 a 9.0
- Buen funcionamiento a baja temperatura.
- Gran velocidad de reacción.
- Bajo peso molecular.
- No dependiente del Ca^{2+}
- Baja especificidad de sustrato.
- Baja actividad de desaminación.

Actualmente, la MTGasa es empleada para mejorar las propiedades fisicoquímicas de una amplia variedad de alimentos de origen animal o proteína vegetal de leguminosas e incluso en productos de panadería (Vigo, 2014).

Tabla 1. Aplicación de MTGasa en el proceso de alimentos

(Kieliszek y Misiewicz, 2013).

Fuente	Producto	Efecto
Carne	Carne reestructurada	Reestructuración de la textura y apariencia de la carne, aumento de la dureza
Pescado	Pasta de pescado, producto reestructurado	Mayor dureza
Leche	Cremas, postres, bebidas lácteas, aderezos	Mejor calidad y textura
Caseína	Proteínas cruzadas	Reducción de la alergenicidad
Trigo	Alimentos horneados	Mejor textura y mayor volumen
Gelatina	Alimentos dulces	Alimentos bajos en calorías con buena textura y elasticidad

2.4.4.1. Carnes reconstituidas o reestructuradas

La capacidad que tiene la MTGasa para inducir enlaces covalentes entre aminos se ha utilizado para producir la llamada carne reconstituida, es decir que esta enzima se puede usar para crear trozos grandes de carne o pescado, prácticamente intactos. Los productores afirman que el tamaño regular de estos productos es más conveniente para los consumidores, además de que el peso y forma permiten un manejo y procesamiento más fácil (Kaufmann *et al.*, 2014).

Para poder hacer la reconstitución de los trozos de carne se lleva a cabo un proceso en el cual se adicionan proteínas no cárnicas o transglutaminasa, esto

sucede a temperaturas de refrigeración durante toda ocho a doce horas. Se ha encontrado que la transglutaminasa por sí sola no puede iniciar las reacciones de entrecruzamiento de carne cruda en su totalidad, por lo que se adiciona caseinato de sodio. La carne reconstituida no requiere un proceso laborioso, además de que no usan sales ni polifosfatos la retener agua. Además, la estabilidad del músculo no se afecta, por ello se mantienen el sabor, textura ((Jozami y Seselovsky, 2003).

La MTGasa actúa como un agente que beneficia la unión de proteínas, debido a sus propiedades funcionales, mejorando la textura y la gelificación de productos cárnicos que son tratados mecánicamente con esta enzima, como las salchichas, aumentando su dureza y firmeza (Santhi *et al.*, 2015).

2.4.4.2. Aplicación en lácteos

Se han realizado estudios en los que se demuestra que las proteínas de la leche son buenos sustratos de la TGasa, lo que sugiere que la enzima tiene un uso potencial en productos lácteos.

Se ha investigado ampliamente los efectos de la TGasa en leche y sus derivados, el suero de leche es más propenso a formar enlaces por acción de la enzima TGasa, con potenciadores como el ditiotreitól.

El suero de leche se comercializa como suplemento proteico, aditivo emulsionador, gelificante, antiespumante y retención de agua.

La caseína no forma geles, aunque con la aplicación de calor, pero es posible formar geles de buena estabilidad térmica después de la aplicación de la enzima TGasas. (Aguilar *et al.*, 2012).

Cuando la transglutaminasa es utilizada para la producción de yogur, la leche es tratada con la enzima, posteriormente es sometido a un proceso térmico para la

inactivación de la enzima, y después se inicia el proceso de la fermentación con la adición de un cultivo iniciador. Aunque también la transglutaminasa se puede ser agregada a la leche a la par que el cultivo iniciador, en este caso la reacción de la enzima procede durante la fermentación. Los principales efectos de la transglutaminasa cuando es usada en la fabricación del yogur es la firmeza y la viscosidad, así como la de retención de agua con lo que se obtiene una disminución de la sinéresis (Kuraishi *et al.*, 2013).

2.4.4.3. Aplicación en pescado

Recientemente, se ha incrementado el diseño de productos funcionales. Sin embargo, el potencial para el desarrollo de productos provenientes del mar con características funcionales aún no se ha explotado completamente. El hecho de que durante el procesamiento de productos pesqueros reestructurados, piezas pequeñas o carne picada se reconfiguran proporciona una excelente oportunidad para incluir algunos ingredientes bioactivos en esta matriz de músculo de pescado (Moreno *et al*, 2015).

La TGasa microbiana ha sido utilizada, en pescado y pastas de subproductos de pescado, esto para producir reestructurados o para mejorar las características de calidad y disminuir la pérdida de materia prima en el procesamiento de filetes de pescado. La producción de surimi es mayor producto elaborado con el empleo de la TGasa microbiana. Existen productos marinos que son abundantes, pero no se comercializan debido a características no compatibles con procesos rápidos, por ejemplo la carpa plateada *Hypophthalmichthys molitrix*, es una especie de bajo consumo por las espinas. En síntesis, la aplicación de la TGasa microbiana mejora de propiedades de organolépticas (Rodríguez, 2013).

La TGasa microbiana también ha mejorado las propiedades mecánicas de los geles de especies, como el salmonete, rayas, permitiendo así la producción de

pastas de surimi con textura apropiada. También se ha utilizado en diferentes especies como el calamar, conejo, cerdo y pavo (Hernández *et al.*, 2016).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de estudio

El proyecto se realizó en el laboratorio de nutrición animal que pertenece a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localizada en Buenavista a 7 km al sur de la ciudad de Saltillo, Coahuila sobre la carretera 54 (Saltillo-Zacatecas), entre las coordenadas geográficas 25° 22' de la latitud norte y 101° 02' longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm. Alcanzando temperaturas de hasta 35°C durante el verano.

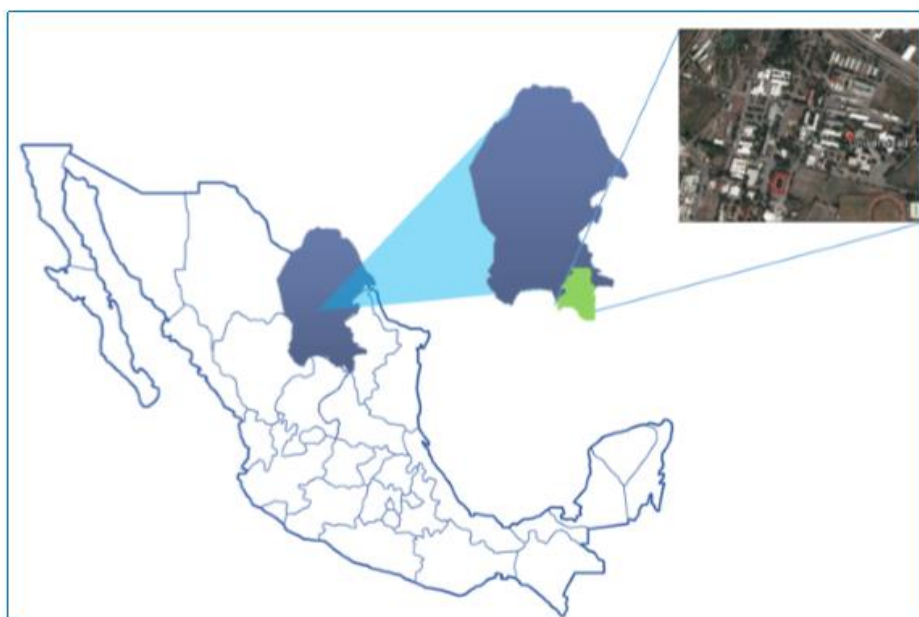


Figura 3. Ubicación del lugar de estudio

3.2. Reactivación de la cepa

3.2.1. Cepa utilizada

La cepa que se utilizó fue *Streptomyces ladakanum* NRRL-3191, que fue proporcionada por el Dr. Oscar Manuel Portilla Rivera, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Tamazunchale, San Luis Potosí.

3.2.1.1. Material y equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- Centrifuga
- Parrilla
- Shaker
- Agitadores
- Matraces
- Micropipeta de 1000 μ L
- Probeta graduada
- Vaso de precipitado
- Termómetro

3.2.1.2. Reactivos

- Glucosa
- Extracto de levadura
- Extracto de malta
- Caldo nutritivo

3.2.1.3. Procedimiento

- a) Se pesó cada uno de los reactivos, del cual se utilizaron 1 g/L de glucosa, 1 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de extracto de malta, 16 g/L de caldo nutritivo.
- b) Se colocó en matraces de 250 ml, 100 ml de agua destilada, y se agregaron los reactivos previamente pesados.
- c) Se utilizó la parrilla de agitación para su completa disolución.
- d) Se esterilizó el medio durante 15 minutos a 121 °C. Una vez esterilizado el medio, se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- e) Se inoculó el medio con la cepa *Streptomyces ladakanum*.

- f) Posteriormente se pasaron los matraces a un skaker con agitación de 250 rpm y una temperatura de 35 °C durante 24 horas.
- g) Transcurrido las 24 horas, el medio se centrifugo a 5000 rpm durante 20 minutos.
- h) Se obtuvo la biomasa por una decantación y el sobrenadante se guardó en el congelador para pruebas posteriores.

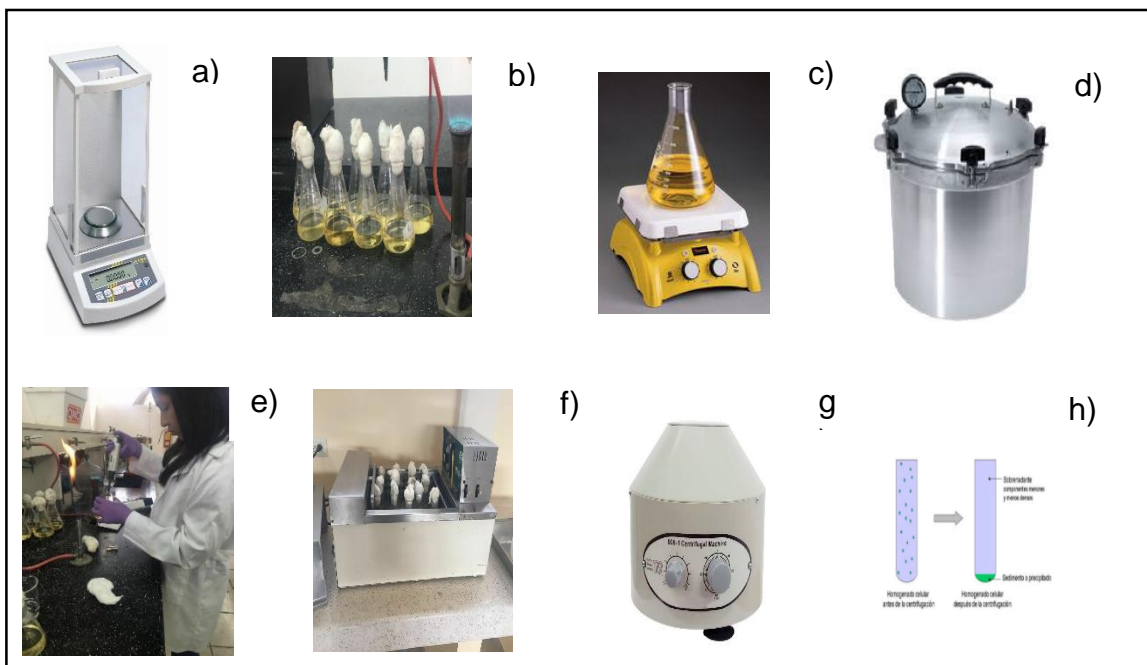


Figura 4. Procedimiento para la reactivación de la cepa

3.2.2. Medio de crioconservación

3.2.2.1. Material y equipo

- Balanza analítica
- Autoclave
- Matraces
- Micropipeta de 1000 μL
- Probeta graduada
- Termómetro
- Tubos ependorf

3.2.2.2. Reactivos

- Agua destilada
- Glicerol
- Leche descremada

3.2.2.3. Procedimiento

- Se midió 10 ml de glicerol y se pesó 8.5 gr de leche descremada, y posteriormente se diluyo este medio en 100 ml de agua destilada.
- Se procedió a esterilizar el medio a 110 °C durante 10 minutos.
- Se colocaron en tubos ependorf 100 μ L de la cepa *Streptomyces ladakanum* y 900 μ L del medio de crioconservación.
- Se guardaron los tubos ependorf en el congelador, para estudios posteriores.

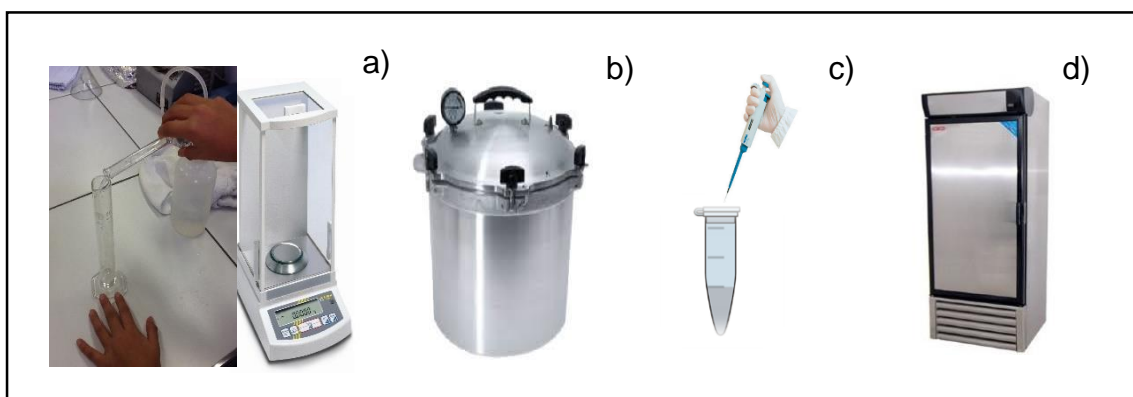


Figura 5. Preparación del medio de crioconservación

3.2.3. Análisis cualitativo del extracto enzimático

3.2.3.1. Material

- Tabla para picar
- Cuchillos

- Papel de empaque
- Carne de cerdo y de res
- Micropipeta

3.2.3.2. Procedimiento

- a) La carne tanto de res como de cerdo, se cortaron en tiras, con un largo de 15 cm por 0.5 cm de ancho.
- b) Se unieron las tiras de carne, cerdo con cerdo y res con res, formando una trenza.
- c) Posteriormente se le aplicó 500 μL del extracto enzimático a la trenza formada por las tiras de carne.
- d) Después se envolvió las trenzas de carne en papel empaque.
- e) Se puso a refrigeración a 4 °C durante 12 horas, monitoreando cada 2 horas.

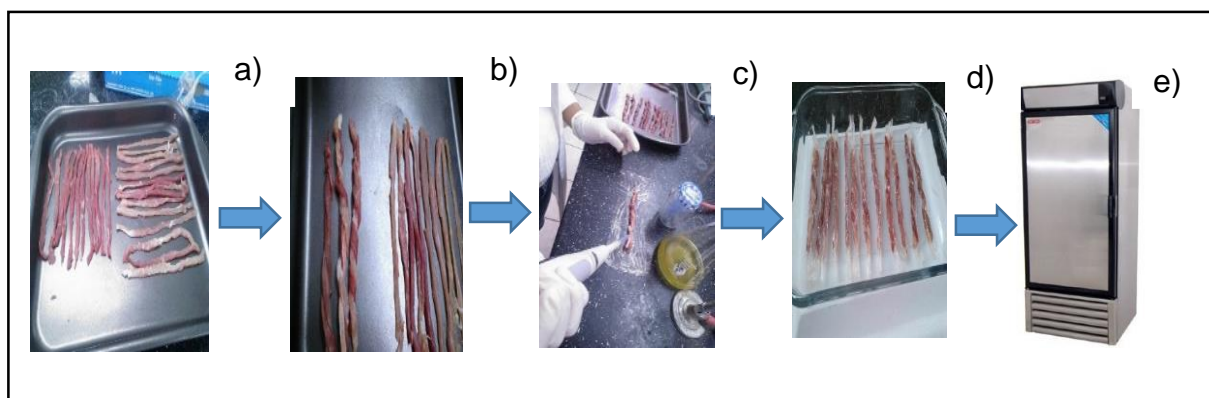


Figura 6. Análisis cualitativo del extracto enzimático

3.3. Conteo de células

Para comenzar el proceso de fermentación se realizó el conteo de células para determinar la cantidad de inóculo a utilizar para este proceso. Para ello se llevó a cabo el estándar de turbidez de McFarland (figura 1) (Aldape, 2013).

Un patrón de turbidez de McFarland se prepara mezclando cloruro de bario al 1% y ácido sulfúrico acuoso al 1%. Cada estándar representa un número aproximado de bacterias en la suspensión, en la tabla 3.1 se observan los volúmenes necesarios de cada solución para obtener las diferentes escalas según McFarland.

3.3.1. Material y equipo

- Tubos de ensayo
- Micropipeta de 100 y 1000 μL
- Agitador (Vortex)
- Espectrofotómetro

3.3.2. Reactivos

- Cloruro de bario al 1%
- Ácido sulfúrico al 1%

3.3.3. Procedimiento

- a) Se colocó la cantidad necesaria de ácido sulfúrico al 1% (según el patrón que se deseara obtener) en un tubo perfectamente limpio y seco,
- b) Se agregó la solución de cloruro de bario al 1% y se agitó perfectamente con la ayuda de un vortex.
- c) Se determinó la absorbancia de la suspensión utilizando un espectrofotómetro UV-VIS (VARIAN) a una longitud de onda de 625nm realizando tres réplicas para cada patrón.

Tabla 2. Preparación del estándar de turbidez McFarland y absorbancias obtenidas.

Patrón de turbidez	Cloruro de bario 1% mL	Ácido sulfúrico 1% mL	Concentración bacteriana (células $\times 10^8$ mL ⁻¹)	Absorbancia 625 nm
0.5	0.025	4.975	1.5	0
1	0.050	4.950	3	0.075
2	0.100	4.900	6	0.240
3	0.150	4.850	9	0.372
4	0.200	4.800	12	0.509
5	0.250	4.750	15	0.677
6	0.300	4.700	18	0.802
7	0.350	4.650	21	0.875
8	0.400	4.600	24	0.967
9	0.450	4.550	27	1.058
10	0.500	4.500	30	1.150

Las absorbancias que se obtuvieron fueron analizadas para obtener una curva patrón como se observa en la figura 7.

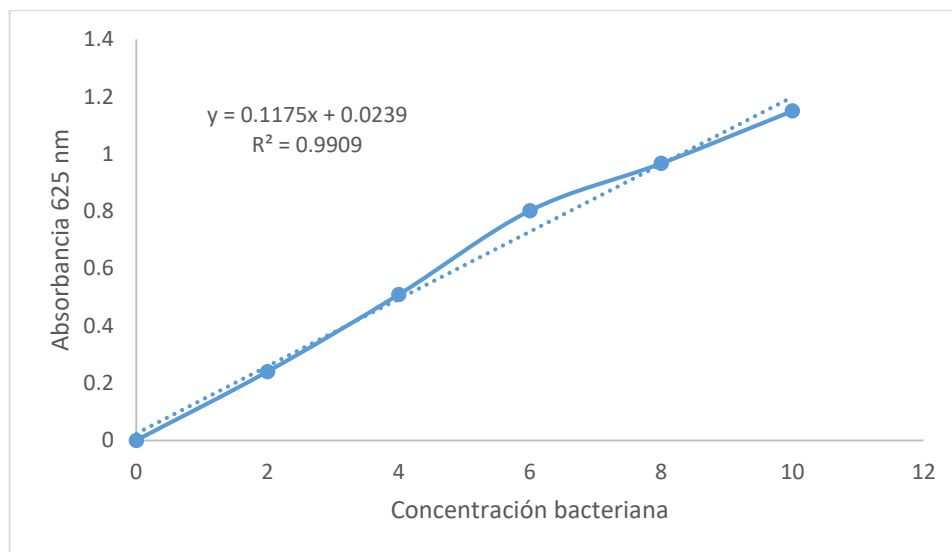


Figura 7. Curva patrón de la escala de McFarland

3.4. Proceso de fermentación

3.4.1. Materiales

- Matraces Erlenmeyer estériles
- Probeta graduada
- Tapones de algodón
- Micropipeta de 20 y 1000 μL
- Puntillas
- Tubos eperndorf

3.4.2. Equipo

- Autoclave
- Mecheros
- Parrilla de agitación

3.4.3. Reactivos

- Fosfato de sodio dibásico
- Fosfato de potasio monobásico
- Sulfato de Magnesio heptahidratado
- Peptona
- Extracto de levadura
- Caseinato de sodio
- Glicerol
- Almidón
- Glucosa

3.4.4. Procedimiento

- a) Se pesaron los reactivos, según lo requerido, lo cual se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3. Medio de cultivo para la fermentación

Nutriente	Concentración g/L
Fosfato de sodio dibásico	5
Fosfato de potasio monobásico	2
Sulfato de Mg heptahidratado	0.5
Peptona	10.5
Extracto de levadura	2.5
Caseinato de sodio	38.4

- b) Posteriormente, se preparó el medio, y se le agregaron los sustratos correspondientes a cada matraz, 15 g de almidón, 15 g de glucosa y 30 g de glicerol. Se esterilizaron los medios preparados. La glucosa se esterilizo por separado para evitar la formación de compuestos tóxicos

debido a la reacción de Maillard, ambos medios se esterilizaron a 121°C por 15 minutos.

- c) Se dejaron enfriar los medios, y se hizo la mezcla de los medios que se esterilizaron por separado.
- d) Se procedió a inocular con 4 µL de *Streptomyces ladakanum* previamente reactivada.
- e) De inmediato se pasó a un shaker, que tenía una temperatura de 26 °C y con agitaciones de 200, 300 y 400 rpm.
- f) El proceso de fermentación duró 120 horas, y se tomaron muestras cada 12 horas.

3.5. Determinación de azúcares reductores

3.5.1. Materiales y reactivos

- NaOH 2N 20 mL
- D.N.S. 1 g en 100 mL
- Frasco ámbar
- Espectrofotómetro
- Celdillas de cuarzo
- Micropipetas

3.5.2. Preparación de reactivo de D.N.S.

- Se mezcló 50 mL de agua más 20 mL de NaOH y D.N.S.
- Se agitó hasta lograr una disolución.
- Una vez disuelto se añadieron 30 g de tartrato de sodio y potasio.
- Se añadió poco a poco disolviendo cada adición.
- Una vez disuelto se almacenó en el recipiente ámbar en refrigeración.

3.5.3. Procedimiento

- a) Se colocaron 0.5 mL de muestra
- b) Se adicionaron 0.5 mL de D.N.S.

- c) Se colocaron las muestras en en baño de ebullición durante 5 minutos.
- d) Se colocaron posteriormente en baño de hielo y agua durante 2 minutos.
- e) Se adicionaron 4 mL de agua destilada.
- f) Se agitaron los tubos en vortex.
- g) Se realizó a lectura a una longitud de onda de 540 nm

3.5.4. Curva estándar

Se utilizó fructuosa (rango de la curva 0.2 a 1 g/L)

Se preparó la solución estándar con 0.01 g de azúcar y se disolvió en 10 mL de agua destilada.

Tabla 4. Preparación de curva estándar de fructosa

No de tubo	0	1	2	3	4	5
Soln. estándar	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Agua destilada	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
D.N.S.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

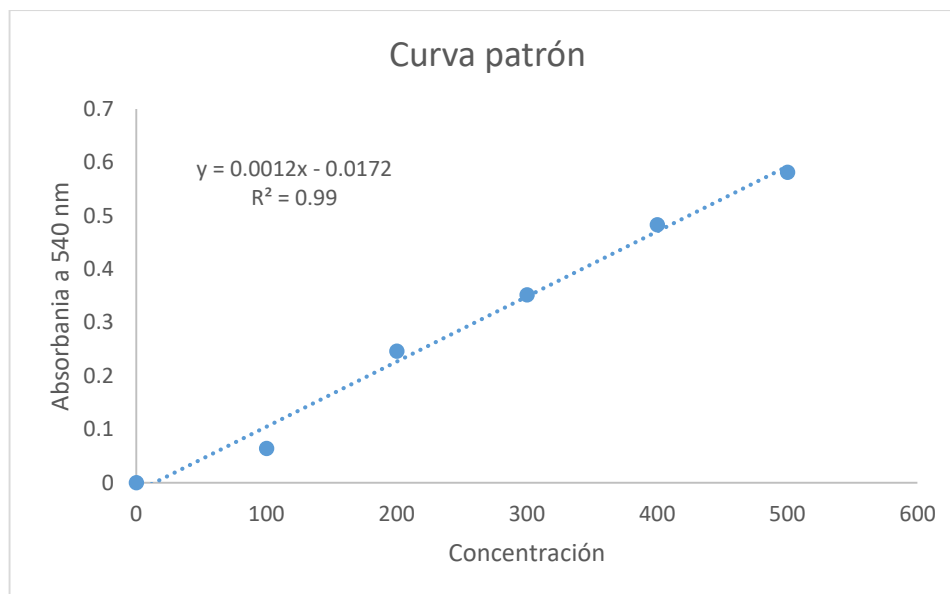


Figura 8. Curva patrón de fructosa

3.5.5. Determinación de azúcares totales

3.5.6. Materiales y reactivos

- Ácido sulfúrico concentrado
- Fenol
- Espectrofotómetro
- Micropipetas

3.5.7. Preparación ácido sulfúrico con fenol

Solución de ácido sulfúrico concentrado con fenol a una concentración de 1 mg/ml y debe usarse durante las 24 horas iniciales de la preparación (0.018g de fenol en 18 ml de ácido sulfúrico concentrado).

3.5.8. Procedimiento

- a) Se colocaron los tubos en un baño de hielo.
- b) Se adiciono 1 mL de muestra.

- c) Se mantuvieron durante 1 minuto en hielo.
- d) Se adicionaron 2 mL de fenol sulfúrico lentamente por las paredes de los tubos (para evitar que la muestra se queme).
- e) Posteriormente se procedió a agitar los tubos dentro del baño de hielo.
- f) Una vez agitado se formó la coloración, amarillo si no es muy alto el contenido, y café cuando la concentración es alta, en tal caso se procede a realizar diluciones.
- g) Los tubos se colocaron en baño de ebullición por 5 minutos.
- h) Los tubos se dejaron a enfriar a temperatura ambiente.
- i) Finalmente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 480 nm.

3.5.9. Curva estándar

Se utilizó una solución estándar de sacarosa (rango de la curva 0.2 a 1g/L) 0.01 g de sacarosa y disolver en 10 mL.

Tabla 5. Preparación de curva estándar de sacarosa

Tubos	0	1	2	3	4	5
Solución estándar mL sacarosa	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Agua destilada mL	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0
Fenol sulfúrico mL	2	2	2	2	2	2

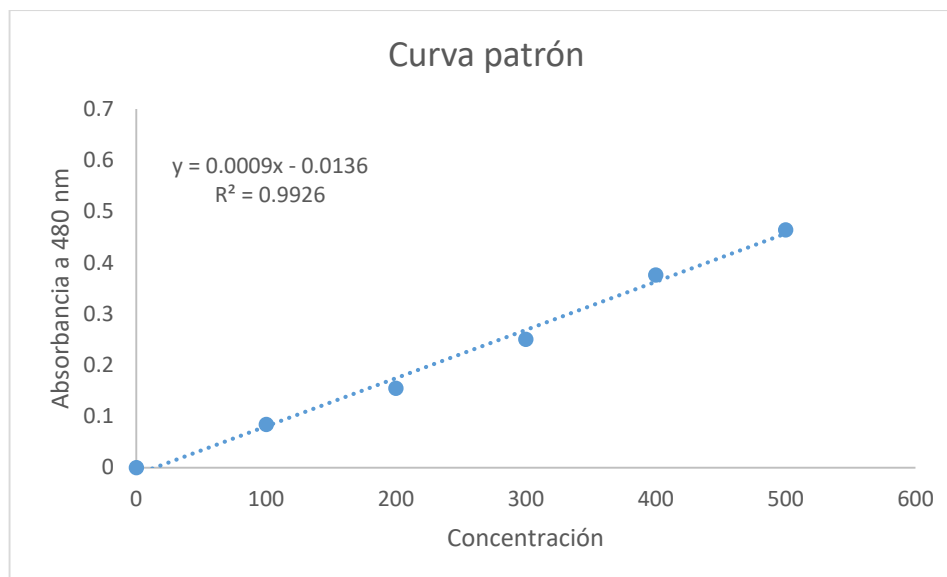


Figura 9. Curva patrón de sacarosa

3.6. Proteína por lowry

3.6.1. Material y equipo

- Agitador (vortex)
- Micropipetas de 1000 μ L
- Tubos de ensayo
- Espectrofotómetro

3.6.2. Preparación de reactivos para medir proteína por el método de Lowry

- Reactivo A
 - Pesar 4 g de hidróxido de sodio 0.1 N
 - Pesar 30 g de carbonato de sodio 2 %
 - Disolver en agua destilada y aforar a 1 L
- Reactivo B₁
 - Pesar 40 g de tartrato de sodio y potasio 4 %
 - Disolver en agua destilada y afora a 1 L

➤ Reactivo B₂

Pesar 20 g de sulfato cúprico 2 %

Disolver en agua destilada y aforar a 1 L

➤ Reactivo C

Es una solución alcalina de cobre, que consiste en mezclar 50 mL del reactivo A con 0.5 mL del reactivo B₁ y 0.5 mL del reactivo B₂ y disolver. Esta solución debe ser preparada al momento de su uso.

➤ Reactivo D

Solución de Folin-Ciocalteu diluida en agua destilada (1:2). Esta solución debe ser preparada al momento de su uso.

3.6.3. Procedimiento

El contenido de proteína soluble se determinó, según el método reportado por Lowry, utilizando tirosina como solución estándar

- a) Se colocaron 100 μ L de la muestra en un tubo de ensayo.
- b) Posteriormente se adicionaron 1000 μ L del reactivo C y se agito con un vortex.
- c) Dejar reposar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- d) Después se colocan 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu previamente diluido en agua (1:2), se agita por 30 segundos en un vortex y se deja reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- e) Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

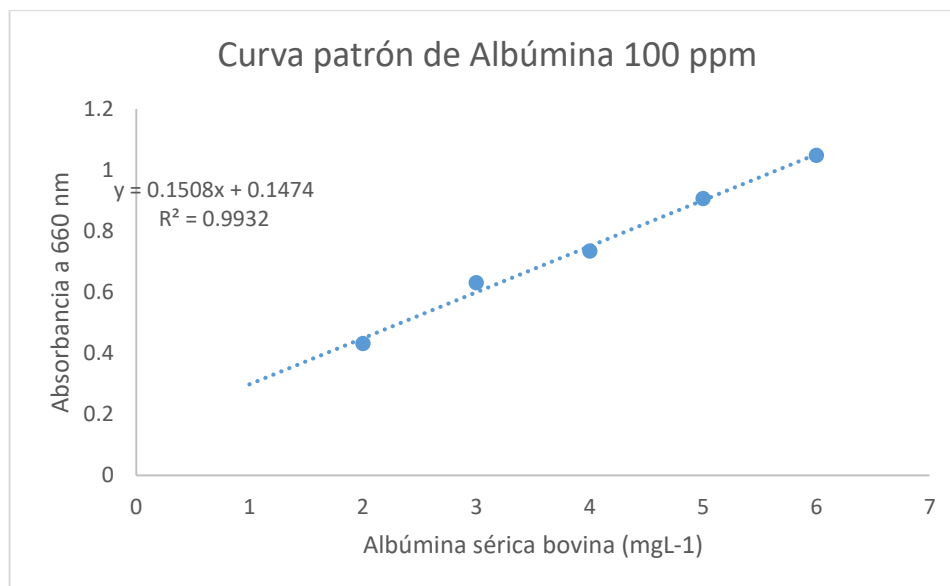


Figura 10. Curva patrón de albúmina

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis cualitativo de la enzima

Para este análisis se utilizó el extracto enzimático que se obtuvo de la reactivación de la cepa. Se utilizaron tiras de carne de pierna de cerdo y pulpa negra, las cuales median 15 cm de largo y 0.5 cm de ancho. Se tomaron las tiras, dos de carne de cerdo y se unieron formando una trenza, lo mismo se hizo con la pulpa negra, y se le agregó 500 μ L del extracto. Al final había un total de 14 trenzas, ya que se monitorearon cada dos horas, a partir de las 0 horas, después a las 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas.

Se observó que a las 8 y 10 horas hubo una adherencia entre los trozos de carne, pero esto solo fue para la carne de cerdo. Aunque la adherencia no se dio en su totalidad, se le puede atribuir a que la enzima no estaba concentrada.

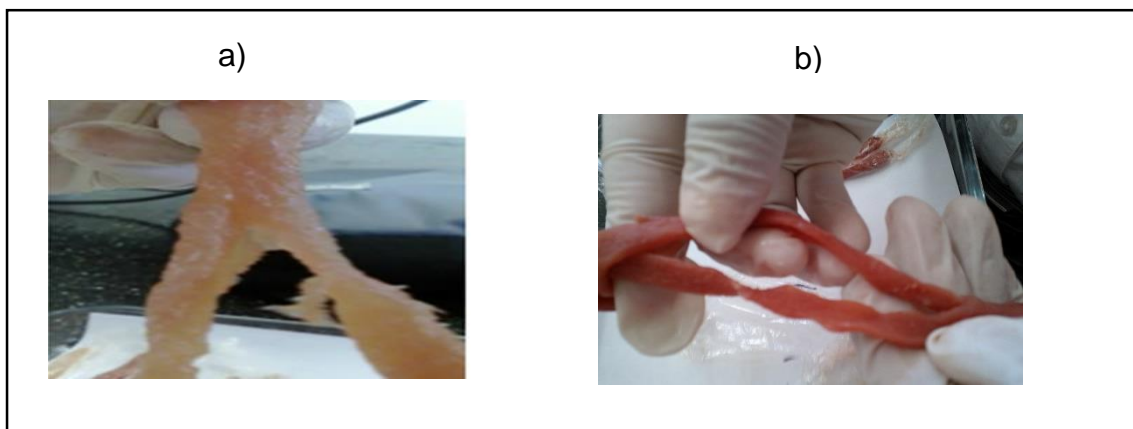


Figura 11. Adherencia: a) carne de cerdo, b) pulpa negra

Se ha encontrado que la caseína es un importante inductor para la liberación de la enzima y para su actividad, al no haber caseína no se libera toda la enzima por lo tanto su actividad es baja, esto no quiere decir que no se produce, sino que no se libera al exterior (Rodríguez, 2013).

De ahí la importancia de utilizar el caseinato, ya que este reacciona con la Tgasa, se vuelve viscoso y funciona como un pegamento uniendo los diferentes productos alimenticios (Aguilar *et al.*, 2012). Por esta razón podría ser que las

tiras de las carnes no hayan tenido la cohesión que se esperaba, además de que la enzima no estaba totalmente concentrada.

4.2. Fermentación

4.2.1. Consumo de sustrato

Se realizó la cinética con 120 horas de fermentación, para el consumo de sustrato se tomaron muestras cada 12 horas. En la siguiente figura (12) se aprecia el consumo del glicerol.

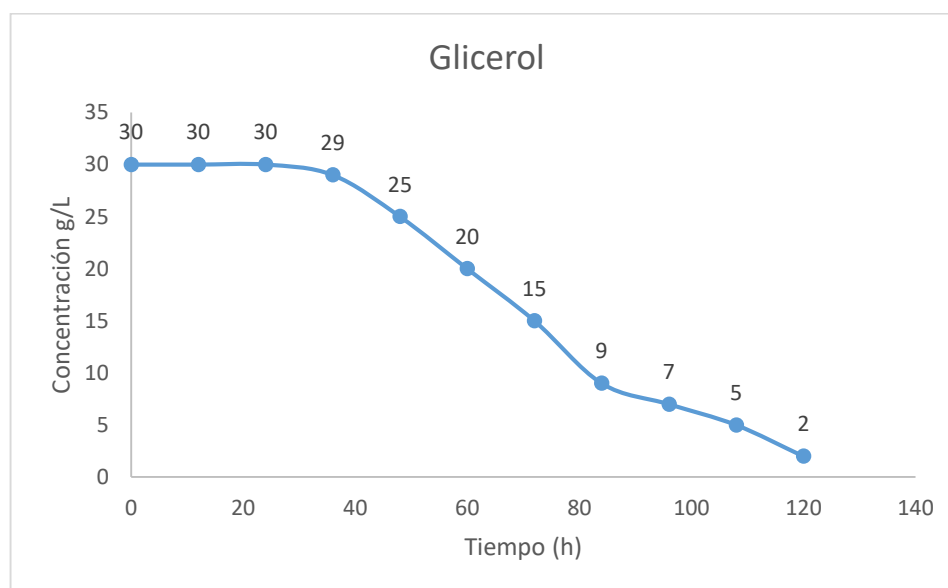


Figura 12. Consumo del glicerol

El consumo del glicerol se puede apreciar con más claridad a partir de las 48 horas y se observa casi un consumo total a las 96 horas. Portilla et al. (2009) registran datos similares para el consumo de sustrato en este caso el glicerol.

Para el caso del consumo de la glucosa podemos observarlo en la figura 13.

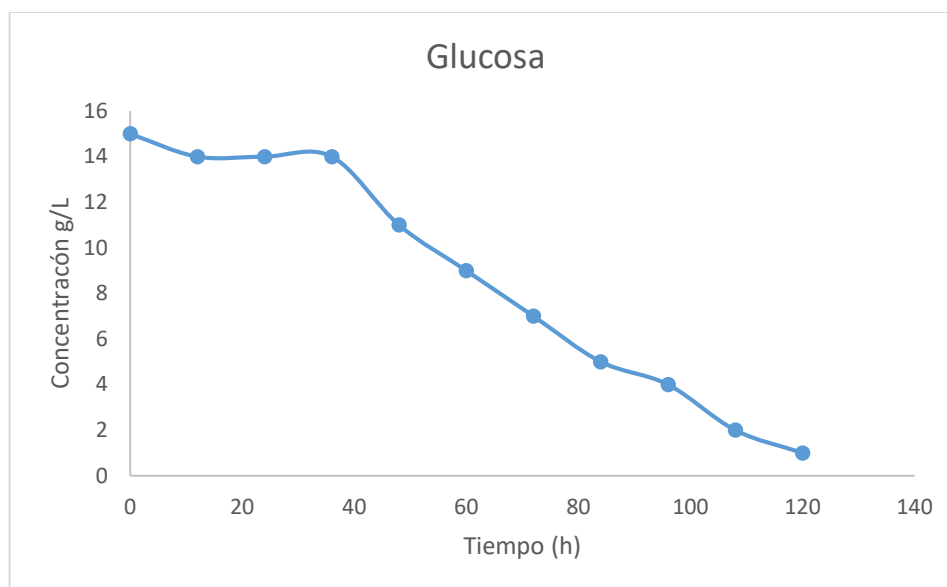


Figura 13. Consumo de glucosa

Lo mismo sucede para este sustrato, ya que su consumo se aprecia mejor entre las 36 y 48 horas, y empieza a tener casi un consumo completo a partir de las 96 horas. De igual manera se ha observado que al utilizar glucosa como sustrato para la producción de la enzima transglutaminasa, su consumo casi total se da a partir de las 96 horas (Rodríguez, 2013).

Para el consumo del almidón fue muy similar a los anteriores sustratos, como se puede observar en la figura 14. Aunque no existen muchos reportes con este sustrato, se puede ver claramente que se consume casi en su totalidad a las 96 horas, el consumo de los sustratos a este tiempo puede deberse a la acción de las proteasas presentes en el medio que actúan sobre la enzima (Rodríguez, 2013).

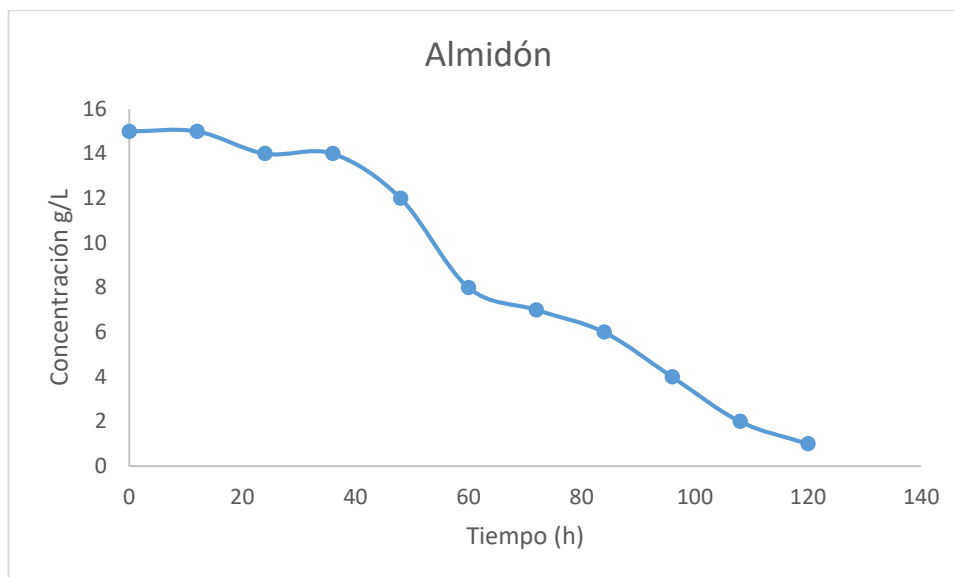


Figura 14. Consumo del almidón

4.3. Azúcares reductores

Se realizó la determinación de azúcares reductores por la técnica de D.N.S. en donde se puede observar que para la glucosa se aprecia una disminución conforme pasa el tiempo de fermentación.

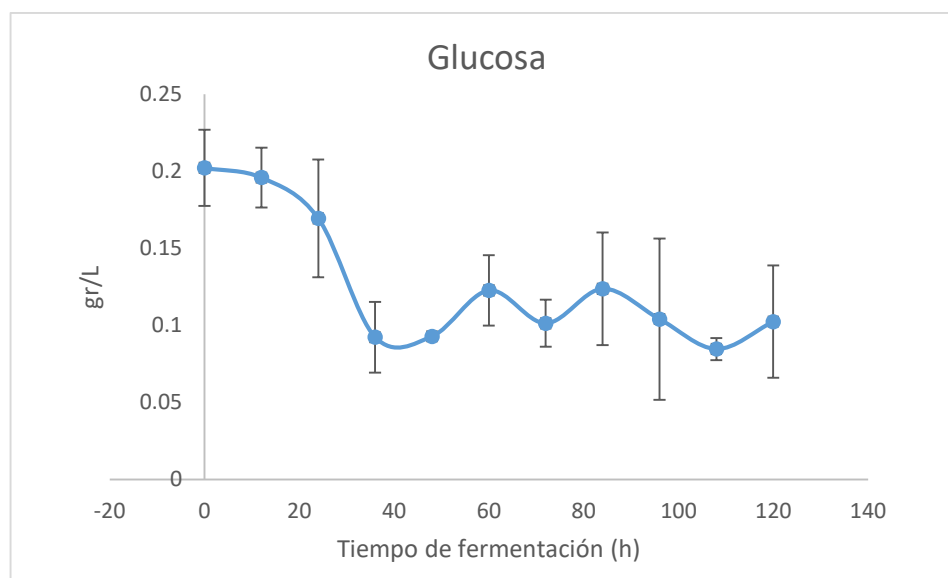


Figura 15. Determinación de azúcares reductores por la técnica de D.N.S.

Ya que para la determinación de azúcares reductores en el glicerol no se utilizó una técnica específica, no se logra observar un descenso lineal de este sustrato.

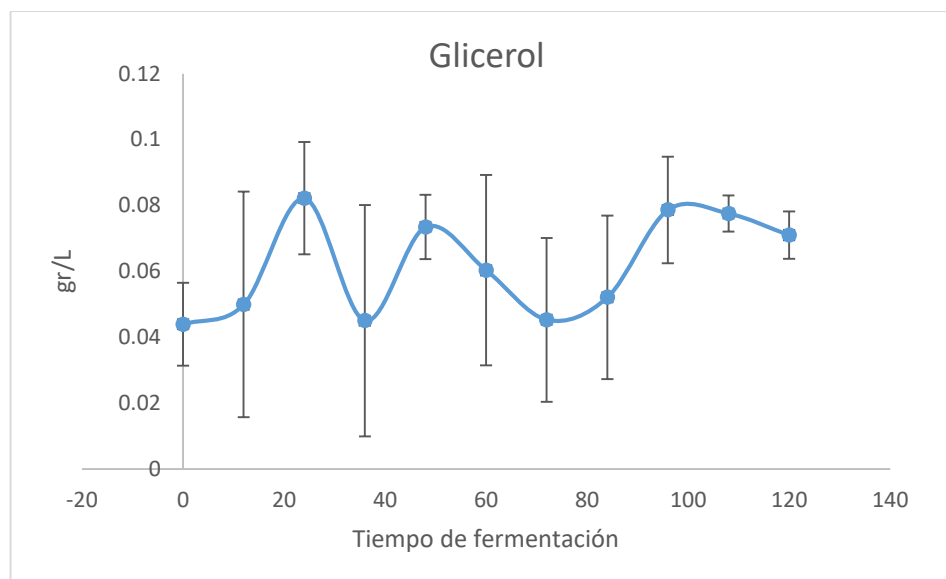


Figura 16. Determinación de azúcares reductores para glicerol

Para el caso del almidón se utilizó también la técnica de D.N.S., en las primeras horas de la fermentación se observa que hay un descenso, y después vuelve a subir, esto puede deberse a que primero el microorganismo tuvo que degradar el almidón para luego poder consumir las moléculas monómericas del mismo.

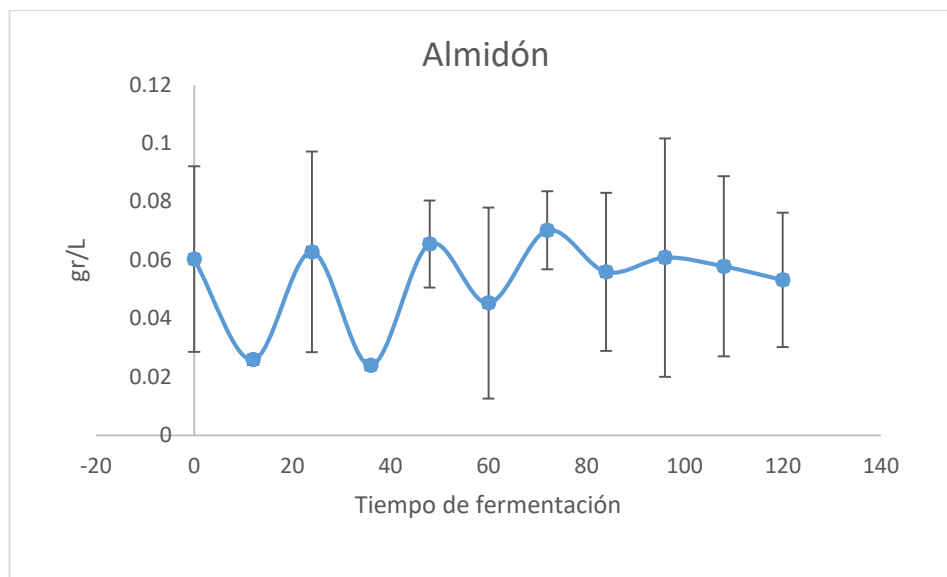


Figura 17. Determinación de azúcares reductores para almidón

4.4. Azúcares totales

En la figura 19 se muestra la determinación de azúcares totales por la técnica de fenol sulfúrico, para la glucosa. De igual manera se utilizó esta técnica para los otros sustratos (fig. 20 y 21).

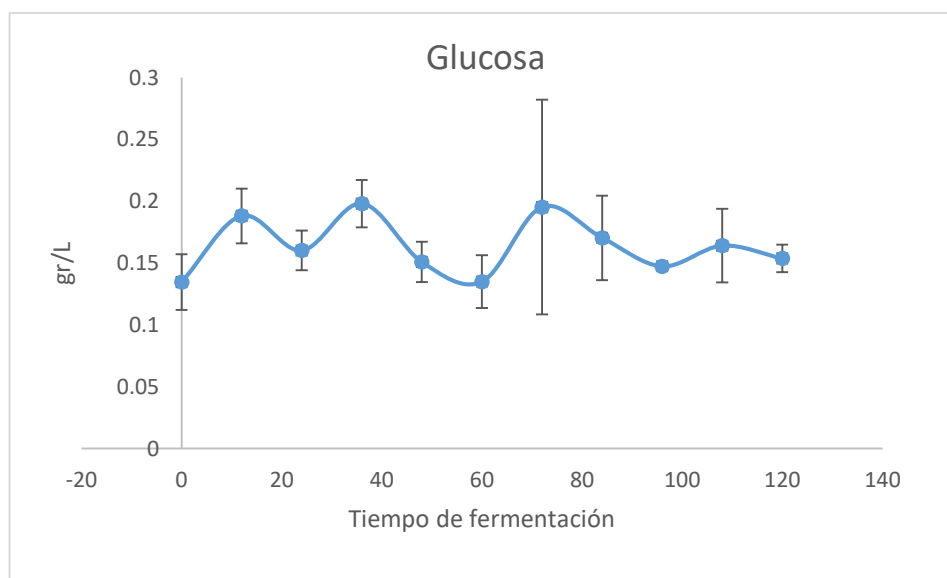


Figura 18. Determinación de azúcares totales por la técnica de fenol sulfúrico en la glucosa

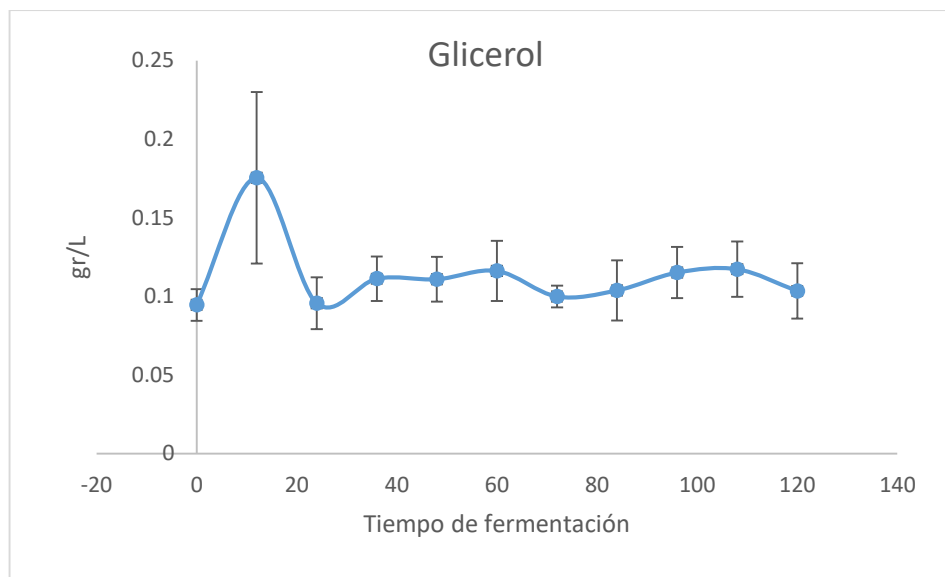


Figura 19. Determinación de azúcares totales para glicerol

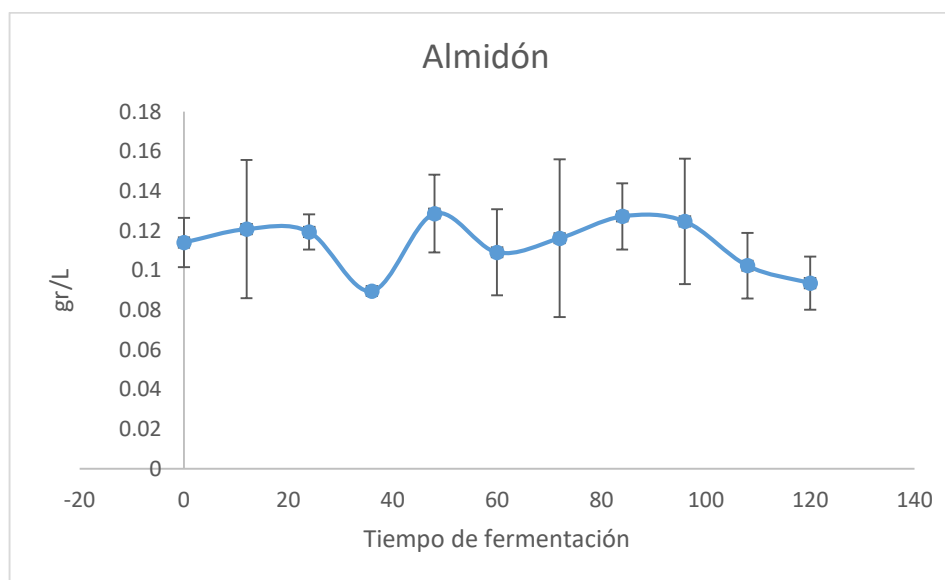


Figura 20. Determinación de azúcares totales para almidón

V. CONCLUSIONES

- Se realizó la reactivación de la cepa *Streptomyces ladakanum* NRRL-3191, realizando una nueva reformulación para poder reactivarla.
- Se hizo una prueba cualitativa del extracto enzimático, con los tres sustratos, y con dos diferentes tipos de carne, de cerdo y de res.
- Se realizó el conteo de las células por el método de McFarland para poder dar inicio a la fermentación.
- Se realizó el proceso de fermentación, monitoreando cada 12 horas por 120 horas. Con esto se pudo determinar consumo de sustrato, además de determinar azúcares totales y reductores.

VI. REFERENCIAS

Abdulatef Mrghni A., Rumiko K., Satoshi K., Kasuyoshi O. Koji N., Takayoshi A. y Michio Muguruma. Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibillar proteins cross-linking. 2007. Elsevier. Food Chemistry.

Aguilar Zarate P., Aguilar Zarate M., Carrillo Inungaray M. L. y Portilla Rivera O. M. Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. 2012. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. Volumen 4, No. 8.

Al-sheddy I. A., Fung Daniel Y. C., Kastner C.L. Microbiology of fresh and restructured lam meat: a review. 2015. Critical Reviews in Microbiology, 21:1, 31-52.

Camolezi Gaspar, A. L., y Pedroso de Góes-Favoni S. Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. 2014. Elsevier. Food Chemistry.

Castellanos, O., Ramírez, D. C., y Montañez V. M. Perspectiva en el desarrollo de las enzimas industriales a partir de la inteligencia tecnológica. Revista Ingeniería e Investigación, Vol. 26, N° 2. 2006. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Facultad de Ingeniería.

Coronel, M. Los vinos de Frutas. Universidad Tecnológica Equinoccial. Consultado el 2 de octubre de 2015. Facultad de Ciencias de la Ingeniería.

Cruz Martínez L. C. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma Koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. 2007. Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Carrera de Microbiología Industrial, Bogotá, D. C.

Díaz Plascencia D. Desarrollo de un inóculo con diferentes sustratos mediante fermentación sólida sumergida. 2009. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología.

Góes Favoni S. P. y Bueno F. R. Microbial Transglutaminase: General characteristics and performance in food processing technology. 2014. Food Biotechnology, 28:1, 1-24.

Grevechova R. y Prieto Contreras L. Biosíntesis de las enzimas pectolíticas a partir de hongos *Aspergillus Niger* y *Aspergillus Foetidus* para aplicación en industria de alimentos. 2006. Revista de Investigación, Universidad La Salle, Facultad de Ingeniería de Alimentos, Bogotá, Colombia. Pp 153-162.

Hernández Robledo V., Martínez Maldonado M. A., Uresti Marín R. M., Ramírez J. A., Velázquez G. Effect of washing treatment and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) proteins. 2016. CyTA - Journal of Food.

James J., Simpson B. K., Marshall M. R. Application of enzymes in food processing. 2013. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36:5, 437-463.

Jozami Barreiro F. y Seselovsky R. Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria, elaboración de carne reconstituida. 2003. Invenio, vol. 6, núm. 10, junio, pp. 157-164.

Kaufmann A., Köppel R., Widmer M.. Determination of microbial transglutaminase in meat and meat products. 2014. Food Additives & Contaminants: Part A, 29:9, 1364-1373

Kieliszeck M., Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. Folia Microbiológica 59(3): 241–250.

Kuraishi C., Yamazaki K., Susa Y. Transglutaminase: Its utilization the food industry. 2013.

Marquez E., Arevalo E., Barboza Y., Rangel L. y Archile A. Efecto de la concentración de transglutaminasa y tiempo de reacción en la estabilidad de productos reestructurados. 2006. Revista Científica, FCV-LUZ/ Vol. XVI, N° 6. 662-667.

Martins I. M., Matos M., Costa R., Silva F., Pascoal A., Estevinho L. M., Choupina A. B. Transglutaminases: recent achievements and new sources. 2014. *Appl Microbiol Biotechnology* 98:6957–6964.

Merino Perez J. y Noriega Borge M. J. Enzimas. *Fisiología general*. Consultado 2016.

Molina Garcia J. M. Enzimas. Departamento de Biología y Geología consultado en 2016.

Moreno H., Herranz B., Pérez-Mateos M., Sanchez-Alonso I., Borderías A. J.. New alternatives in seafood restructured products. 2015. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Nielsen P. M. Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literatura and patents. 2013. *Food Biotechnology*, 9:3, 119-156.

Palafox Carlos H. y García Carreño F. Transglutaminasas: el importante papel fisiológico en los seres vivos al desarrollo novedoso de Tecnología de Alimentos. Consultado en octubre de 2016. Centro de Investigación del Noreste. Mar Barnejo 195. La Paz, BCS, México.

Pliego Sandoval J., Amaya Delgado L., Mateos Diaz J. C., Rodriguez J., Cordoba J., Alba A., Jaubert S., Herrera Lopez E. J. Multiplex gas sampler for monitoring respirometry in column-type bioreactors used in solid-state fermentation. 2016. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26:3, 3031-3038.

Portilla Rivera O. M., Tellez Luis S. J., Ramirez de Leon J. A., Vázquez M. Production of Microbial Transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. 2009. *Food Technology Biotechnology* 47 (1) 19–26.

Rivera Pérez C., García Carreño F. Enzimas lipolíticas y su aplicación en la industria del aceite. 2007. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, 23000, México.

Rodríguez Castillejos G. C. Producción biotecnológica de transglutaminasa microbiana a partir de hidrolizados de sorgo y maíz y su aplicación en

reestructurados cárnicos y pesqueros. 2013. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia aplicada y Tecnología Avanzada, CICATA-IPN, Unidad Altamira

Salinas Roca A. Desarrollo de un Producto Reestructurado a partir de Carne de Res de Bajo Valor Comercial. 2007. Zamorano, Honduras.

Sanlier N., Busra Basar G., Ceyhun Sezgin A. Health benefits of fermented foods. 2017. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

Santhi D., Kalaikannan A., Malairaj P., Prabhu S. Application of microbial transglutaminase in meat foods: a review. 2015. Department of Meat Science and Technology, Veterinary College and Research Institute, Namakkal, Tamil Nadu, India. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.

Segura Vilchez J. y Navarrete Coronado R., Enzimas microbianas para producir moléculas con potencial uso terapéutico, el caso del xilitol. 2012. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXIX (600) 25-29, 2012.

Serrano, Y. Proceso de fermentación. Consultado el 2 de octubre de 2015

Seswita Zilda D, Microbial Transglutaminase: source, production and its role improve surimi properties. 2014. Squalen Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology, 9 (1), 2014, 35-44.

Shirai Matsumoto, K. y Malpica Sánchez, F. P. Manual de prácticas de Laboratorio, Tecnología de Fermentaciones Alimentarias. 2013. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Sokullu E., Bas D., Hakk Boyac I., Oner Z., Gül Karahan A., Cakir I., Lütfü Cakmakc M. Determination of transglutaminase activity using fluorescence spectrophotometer. 2015. Food Biotechnology, 22:3, 297-310

Sun X. D. Utilization of restructuring technology in the production of meat products: a review. 2014. CyTA - Journal of Food, 7:2, 153-162,

Vásquez Vanegas A. M. Producción de Xilanasas por *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. 2013. Universidad Iberoamericana.

Vigo Contreras C. M. Caracterización físico-químicas de un reestructurado de carne de alpaca (*Vicugna pacos*) con inclusión de pecana (*Carya illinoensis*) y transglutaminasa. 2014. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria.

Washizu K., Ando K., Koikeda S., Hirose S., Matsuura A. Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptomyces lividans* and its expression in *Streptomyces lividans*. 2014. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58:1, 82-87

Zhang D., Zhu Y., Chen J. Microbial transglutaminase production: understanding the mechanism. 2013. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 26:1, 205-222