

APLICACIÓN DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN QUESOS FRESCOS DE COAGULACIÓN ÁCIDA Y DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

Ana Maria Cadavid Tobón

Per citar o enllaçar aquest document:

Para citar o enlazar este documento:

Use this url to cite or link to this publication:

<http://hdl.handle.net/10803/667397>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA
EN QUESOS FRESCOS DE COAGULACIÓN ÁCIDA
Y DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

Ana Maria Cadavid Tobón

2018



TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN QUESOS FRESCOS DE COAGULACIÓN ÁCIDA Y DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

Ana Maria Cadavid Tobón

2018

PROGRAMA DE DOCTORADO EN TECNOLOGÍA

Dirigida por:

Dra. Elena Saguer Hom

Memoria presentada para optar al título de doctora por la Universitat de Girona



La Dra. Elena Saguer Hom, del Institut de Tecnologia Agroalimentària (INTEA) de la Universitat de Girona

DECLARO: Que el trabajo titulado **APLICACIÓN DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN QUESOS FRESCOS DE COAGULACIÓN ÁCIDA Y DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA**, que presenta **Ana Maria Cadavid Tobón** para la obtención del título de doctora, se ha realizado bajo mi dirección.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmo el presente documento.

Firma

Girona, 25 de septiembre de 2018

A mi familia, mi todo...

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer profundamente a la empresa BDF Natural Ingredients por darme la oportunidad de llevar a cabo esta tesis doctoral. De manera especial a Jordi Bosch, por abrirme las puertas de la empresa y por la confianza depositada, poniendo a disposición los recursos necesarios para el desarrollo de este proyecto, así como un ambiente inigualable de trabajo. A Laia Bohigas, por la orientación de la tesis desde BDF, compartiendo sus conocimientos y siendo una guía y apoyo constante durante este tiempo. Y a Núria Martínez, por hacer posible el comienzo de este recorrido y por todo lo compartido.

Agradezco profundamente a mi directora, Elena Saguer, quien ha sabido dirigir esta tesis doctoral, no solo desde lo académico, con sus conocimientos y su gran trabajo, sino también desde lo humano, haciendo de esta una experiencia en la que además del aprendizaje y el esfuerzo, también hubo tiempo para crear recuerdos muy especiales.

Gracias a todo el equipo técnico y de I+D de BDF. A Mariona por su tiempo, porque sin su inmensa ayuda, guía y enseñanzas en el laboratorio este proyecto no estaría completo, así como a Pere y Xell, por la paciencia y el soporte con las pruebas y el material de laboratorio. A Marga, por todo el apoyo técnico y emocional a lo largo de este tiempo, en compañía de Alba, Valeria y Laia, por toda la colaboración en las pruebas interminables, la paciencia con el material y las conversadas en el laboratorio, entre muchas otras cosas. Y al Office Team de BDF, Marta, Mar y Sergi, por la excelente acogida, el buen rollo y toda la comprensión y apoyo durante este último tiempo del desarrollo de la tesis.

Agradezco también a Carmen Carretero del INTEA, por su soporte para concretar el desarrollo de la tesis en la Universitat de Girona, así como a Anna Maria Aymerich, Nuri Cabezas y Gemma Rustullet por su colaboración para con el desarrollo de los experimentos llevados a cabo en la UdG. Igualmente, a Mónica Toldrà y a Dolors Parés por su asesoramiento tanto en cuestiones técnicas, como de gestión en la universidad. A Miriam y a Pol, por toda su ayuda.

Gracias inmensas a mis tres del Carrer Migdia. Nada hubiera sido igual a lo largo de estos años en Girona, si no hubieran estado ahí. A Jordi, por su inmenso corazón, por aguantarme tanto y por introducirme al increíble mundo de los catalanes. A Klemen, por estar ahí cuando más lo he necesitado, por las conversaciones existenciales, los consejos y la cantaleta... “además del soporte técnico, experimental y moral durante todo el proyecto de tesis”... Y a Anny por esa chispa que nos alegra la vida, por las ocurrencias y por todo el cariño y la ternura de siempre.

A todos lo que aquí o allá han continuado cerca de mí, con un consejo, una bonita amistad, risas, canciones y mucho fútbol, y que hacen parte de momentos maravillosos que hemos compartido y que han hecho más llevadero el trabajo de la tesis durante los últimos años. Y a Pepis, por todo el amor, el cuidado y los momentos especiales que hemos compartido.

Finalmente, gracias de todo corazón a lo más preciado que tengo en la vida -Papi, Mami, Jou- por todo su amor y apoyo, por estar siempre a mi lado de manera incondicional, porque nada de lo que soy ahora tendría sentido sin tenerlos en mi vida.

¡GRACIAS TOTALES!

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la Varianza
BDF	BDF Natural Ingredients SL
CFSAN	Centro para la Seguridad Alimentaria y Nutrición Aplicada
CN	Caseína
CMP	Caseinomacropéptido
Ct	Control
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FPC	Quimosina Producida por Fermentación
FXIII	Factor XIII del sistema de coagulación de la sangre
GRAS	Generalmente Reconocido como Seguro
GTP	Guanosín trifosfato
IDF	Federación Internacional de Lácteos
MPC	Concentrado de Proteína Láctea
MTG	Preparado comercial a base de Transglutaminasa Microbiana
<i>MTGasa</i>	Transglutaminasa Microbiana
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPS	Organización Panamericana de la Salud
R-PF	Porcentaje de rendimiento en peso fresco
R-PS	Porcentaje de rendimiento en peso seco
SD	Desviación Estándar
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecilsulfato Sódico
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TG#	Transglutaminasa Tipo #
<i>TGasas</i>	Transglutaminasas
UE	Unión Europea
UF	Ultrafiltración

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Principales reacciones catalizadas por las transglutaminasas: A) reacción de polimerización; B) reacción de transferencia de un grupo acilo; y C) reacción de desamidación

Figura 1.2. Estructura tridimensional de la *MTGasa*, mostrando la tríada catalítica Cys⁶⁴, Asp²⁵⁵ e His²⁷⁴

Figura 1.3. Mecanismo catalítico hipotético de la *MTGasa*, propuesto por Kashiwagi *et al.* (2002)

Figura 1.4. A) Estructura terciaria de la *MTGasa* mostrando en color amarillo-oro el centro activo del zimógeno bloqueado por una pro-secuencia con estructura en α -hélice; B) eliminación de dicha pro-secuencia dejando al descubierto el centro activo

Figura 1.5. Actividad relativa de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* o transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) en función del pH

Figura 1.6. Actividad relativa de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* (*MTGasa*) o transglutaminasa microbiana en función de la temperatura

Figura 1.7. Actividad residual de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* o transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) en función de la temperatura tras un período de tratamiento de 10 min y a pH 7.0

Figura 1.8. Etapas en el proceso de coagulación enzimática de la leche para la elaboración de queso

Figura 2.1. Diagrama de flujo para la obtención de los quesos de coagulación ácida tipo quark

Figura 2.2. Diagrama de flujo para la obtención de quesos de coagulación enzimática. MTG/C: tratamiento con *MTGasa* previo a la adición de cuajo; MTG+C: adición conjunta de *MTGasa* y cuajo

Figura 2.3. Diagrama de flujo para la obtención de análogos de queso a partir de concentrado de proteína de leche (MPC) y nata

Figura 3.1. Rendimiento (R) del queso en función de la concentración de MTG aplicada durante el proceso de elaboración de queso quark: en términos de peso fresco (PF – en blanco); y en términos de peso seco (PS – en negro)

Figura 3.2. Porcentaje (p/p) de pérdidas no controladas, finos y suero durante el proceso de elaboración del quark en función de la concentración de MTG

Figura 3.3. Contenido de agua (arriba) y de proteína (abajo) del quark, como una función de la concentración de MTG empleada en el proceso de producción

Figura 3.4. Perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras de las fracciones sérica (a) y caseínica (b) de los quarks, sometidos a tratamientos con *MTGasa* a diferentes niveles (0 - 0.6 mg·L⁻¹). Std: patrones de peso molecular

Figura 3.5. Micrografías en microscopía electrónica de barrido, mostrando el efecto del tratamiento de leche para la producción de queso con *MTGasa* a diferentes concentraciones, en la microestructura de los quarks

Figura 3.6. Dureza del queso como una función de la concentración de MTG

Figura 4.1. Cinéticas de coagulación obtenidas para los distintos cuajos en función del tratamiento aplicado: ○: Control, incubación solo con cuajo; ▲: MTG/C, pre-incubación con *MTGasa* seguida de incubación con cuajo; ■: MTG+C, incubación con *MTGasa* y cuajo simultáneamente

Figura 4.2. Porcentaje de rendimiento de quesos de coagulación enzimática, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Control, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (CHY-MAX, Maxiren, Fromase)

Figura 4.3. Porcentaje de la fracción de finos de los quesos de coagulación enzimática en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Control, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (CHY-MAX, Maxiren, Fromase)

Figura 4.4. Dureza de los quesos en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Control, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (CHY-MAX, Maxiren, Fromase)

Figura 4.5. Perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras de las fracciones caseínicas de los quesos de coagulación enzimática, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG) en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (Fromase, CHY-MAX, Maxiren)

Figura 4.6. Micrografías SEM de los quesos de coagulación enzimática elaborados con CHY-MAX, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C)

Figura 4.7. Micrografías SEM de los quesos de coagulación enzimática elaborados con Maxiren, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C)

Figura 4.8. Micrografías SEM de los quesos de coagulación enzimática elaborados con Fromase, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG) en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C)

Figura 5.1. Perfiles electroforéticos del concentrado de proteína de leche MPC 65 y de leche cruda, obtenidos con la técnica SDS-PAGE en condiciones reductoras. Std: estándares de peso molecular

Figura 5.2. Dureza de los análogos de queso elaborados con distintos niveles de *MTGasa*

Figura 5.3. Curvas Fuerza-Tiempo correspondientes a análogos de queso tratados con distintos niveles de *MTGasa*, utilizando dos cuajos diferentes: a) CHY-MAX y b) Fromase

Figura 5.4. Adhesividad (en valor absoluto) de los análogos de queso elaborados con distintos niveles de *MTGasa* en función del tipo de cuajo

Figura 5.5. Curvas Fuerza-Tiempo correspondientes a quesos UF comerciales: en gris, Burgo de Arias; en negro, Hacendado

Figura 5.6. Sinéresis forzada expresada como porcentaje de agua liberada de los análogos de queso, tratados con distintos niveles de *MTGasa*, en función del tipo de cuajo aplicado (CHY-MAX o Fromase)

Figura 5.7. Perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras de las fracciones caseínicas de los análogos de queso de coagulación enzimática en función de la concentración de *MTGasa* aplicada para cada uno de los agentes coagulantes ensayados (CHY-MAX, Fromase)

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características de las *TGasas* presentes en mamíferos

Tabla 1.2. Géneros y/o especies de microorganismos con cepas productoras de la enzima transglutaminasa

Tabla 1.3. Reactividad de algunas proteínas alimentarias frente a la *MTGasa*

Tabla 3.1. Composición química de suero y de finos, dependiente de la concentración de MTG empleada durante la producción del queso

Tabla 3.2. Contenido de cenizas y calcio en las muestras de quark, como función de la concentración de *MTGasa*

Tabla 4.1. Composición química de los sueros obtenidos durante el proceso de elaboración de quesos frescos de coagulación enzimática en función del agente coagulante utilizado y del tratamiento o no con *MTGasa*

Tabla 4.2. Composición química de los quesos frescos de coagulación enzimática, en función del agente coagulante utilizado y del tratamiento o no con *MTGasa*

Tabla 5.1. Caracterización fisicoquímica de los ingredientes utilizados para la elaboración de los análogos de queso de coagulación enzimática: concentrado de proteína de leche (MPC 65) y nata láctea comercial

Tabla 5.2. Caracterización fisicoquímica de los análogos de queso de coagulación enzimática, obtenidos en función del tipo de cuajo y el nivel de *MTGasa*

Tabla 5.3. Propiedades texturales (firmeza, consistencia y relación entre trabajo durante la etapa de retirada de la sonda -TUp- y trabajo total -TT-), de los análogos de queso elaborados con distintos niveles de *MTGasa*

ÍNDICE

RESUMEN	V
RESUM.....	IX
ABSTRACT	XIII

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Contexto de la problemática global	2
1.2 Transglutaminasas (<i>TGasas</i>)	5
1.3 Transglutaminasa microbiana de <i>Streptomyces mobaraensis</i> (<i>MTGasa</i>)	13
1.3.1 Pro-transglutaminasa	15
1.3.2 Factores reguladores de la actividad de la <i>MTGasa</i>	16
1.3.2.1 Efecto del pH y la temperatura.....	17
1.3.2.2 Estimuladores de la actividad	19
1.3.2.3 Inhibidores de la actividad.....	19
1.3.2.4 Características del sustrato	20
1.4 La <i>MTGasa</i> en la industria alimentaria: beneficios.....	21
1.4.1 Aplicaciones en la industria alimentaria	23
1.4.1.1 Elaboración de quesos frescos	26
1.4.1.1.1 Quesos de coagulación ácida tipo quark	28
1.4.1.1.2 Quesos de coagulación enzimática.....	29
1.4.1.2 Obtención de análogos de queso	34
1.5 Objetivos.....	40

CAPÍTULO 2.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
2.1 Material.....	45
2.2 Elaboración de quesos de coagulación ácida tipo quark	46
2.2.1 Obtención de la cuajada	46
2.2.2 Obtención del queso a partir de la cuajada	48
2.3 Determinación de las cinéticas de coagulación enzimática	48
2.4 Elaboración de quesos de coagulación enzimática	49
2.4.1 Obtención de la cuajada.....	49
2.4.2 Obtención del queso a partir de la cuajada	49
2.5 Elaboración de análogos de queso de coagulación enzimática	51
2.6 Determinación del rendimiento quesero	53
2.7 Análisis composicional de leche, suero, fracción de finos y queso.....	53
2.8 Análisis del perfil proteico: SDS-PAGE en condiciones reductoras	53
2.9 Análisis de textura.....	54
2.10 Sinéresis forzada	55
2.11 Análisis de la microestructura: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	55
2.12 Análisis estadístico	56

CAPÍTULO 3.

EFECTO DEL TRATAMIENTO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (MTGasa) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE QUESOS DE COAGULACIÓN ÁCIDA TIPO QUARK

3.1 Diseño Experimental	59
3.2 Resultados y discusión	59
3.2.1 Efecto del tratamiento térmico	59
3.2.2 Rendimiento quesero	61
3.2.3 Análisis composicional de suero y fracción de finos	64
3.2.4 Análisis composicional del quark	66
3.2.5 Perfil electroforético	68
3.2.6 Microestructura del queso	69
3.2.7 Textura	71
3.3 Conclusiones	72

CAPÍTULO 4.

APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (MTGasa) EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS FRESCOS DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

4.1 Diseño Experimental	78
4.2 Resultados y discusión	79
4.2.1 Cinética de coagulación de los cuajos	79
4.2.2 Rendimiento quesero	82
4.2.3 Composición química de suero y queso	86
4.2.4 Textura del queso	90
4.2.5 Perfil proteico	93
4.2.6 Microestructura del queso	95
4.3 Conclusiones	98

CAPÍTULO 5.

ELABORACIÓN DE ANÁLOGOS DE QUESO DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA CON ADICIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (MTGasa)

5.1 Diseño Experimental	102
5.2 Resultados y discusión	102
5.2.1 Caracterización fisicoquímica de los ingredientes	102
5.2.2 Caracterización fisicoquímica de los análogos de queso	104
5.2.3 Textura de los análogos de queso	105
5.2.4 Sinéresis forzada	113
5.2.5 Perfil proteico	115
5.3 Conclusiones	117

CAPÍTULO 6.

DISCUSIÓN GENERAL 121 |

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIONES 137 |

BIBLIOGRAFÍA. 141 |

RESUMEN

Las propiedades nutricionales y sensoriales han hecho del queso un producto altamente consumido a nivel mundial. El hecho de facilitar la conservación de los componentes de la leche en su matriz supuso la introducción del queso en la dieta humana, y con el tiempo se han desarrollado una gran cantidad de variedades, con diversos sabores y texturas, determinadas además por las costumbres y culturas de las diferentes regiones del mundo. Esto ha llevado a un incremento importante en su consumo desde finales del siglo pasado, así como a la búsqueda de nuevas herramientas que permitan optimizar la producción quesera y, al mismo tiempo, dar solución a un importante problema medioambiental provocado por la incorrecta disposición final del suero con una gran carga de materia orgánica, que resulta de la elaboración del queso y que ha ido en aumento con la expansión de la industria quesera mundial. Con los recientes avances en el campo de la biotecnología y la búsqueda de alternativas que permitan optimizar los procesos de la industria alimentaria, la Transglutaminasa Microbiana (*MTGasa*) ha resultado un enfoque novedoso, con un gran potencial para el desarrollo de nuevos productos y para la mejora de la calidad y la funcionalidad de los ya existentes. Su capacidad para catalizar reacciones de transferencia del grupo acilo entre el grupo γ -carboxamida de residuos de glutamina presentes en péptidos y proteínas, y una variedad de aminas primarias, permiten la formación de diferentes productos en función de las moléculas involucradas. De las tres reacciones principales que puede catalizar la *MTGasa*, la de mayor interés para su aplicación en el sector alimentario es la del entrecruzamiento de proteínas, lo cual puede provocar cambios importantes en el comportamiento de las macromoléculas de la matriz alimentaria.

En la leche, las proteínas susceptibles de ser tratadas con *MTGasa* son las proteínas séricas y las caseínas. Estas últimas constituyen un excelente sustrato para la enzima, debido a que casi no poseen una estructura secundaria, lo cual facilita el acceso a los residuos aminoacídicos de la proteína implicados en la reacción enzimática, haciéndola más vulnerable a la acción de la *MTGasa*. En contraste, la naturaleza globular de las proteínas séricas hace que tiendan a ser sustratos menos reactivos con la enzima, llegando a interactuar únicamente bajo condiciones que favorezcan su despliegue total o parcial. Estudios acerca de la aplicación de la *MTGasa* en quesos indican que el tratamiento con esta enzima permitiría incrementar el rendimiento de la cuajada y mejorar algunas de sus características. En este sentido, el objetivo de esta tesis doctoral fue evaluar la aplicación de la *MTGasa* producida por la empresa BDF Natural

Ingredientes en la elaboración de quesos frescos tanto de coagulación ácida como enzimática y de un queso análogo, a partir de sus efectos en el rendimiento quesero y en la calidad del producto final, básicamente en cuanto a composición química y textura, tomando como referencia el tratamiento sin *MTGasa*. Los perfiles electroforéticos de la fracción caseínica de los quesos junto con su microestructura se evaluaron con la finalidad de analizar la implicación de la enzima en los cambios observados.

El tratamiento enzimático con *MTGasa* de los quesos frescos permitió la obtención de valores de rendimiento superiores, en comparación con las muestras Control. En el caso de los quesos de coagulación ácida, se incrementó el rendimiento en una relación dependiente de la concentración de *MTGasa* aplicada en el rango ensayado, llegando a valores de hasta un 19% respecto al Control. Este incremento se dio gracias a una mayor retención de agua y a la menor pérdida de proteínas asociadas a la fracción de finos. Esto se tradujo, además, en la obtención de quesos más nutritivos, debido a su mayor contenido en proteína, aunque tanto en relación a la composición como a la mayoría de parámetros analizados, la sobredosificación de la enzima conlleva un retroceso en las mejoras obtenidas. En los quesos de coagulación enzimática, el efecto de la *MTGasa* fue evaluado según el momento de adición de la *MTGasa* durante el proceso de producción (previa o conjuntamente a la adición del agente coagulante) y para tres tipos de cuajo diferentes. Para todos ellos, el tratamiento con *MTGasa* también incrementó el rendimiento respecto al Control, sin importar el momento de adición; tampoco se observó un patrón de comportamiento distinto en función del tipo de cuajo empleado. En este caso, el incremento en el rendimiento se debió exclusivamente a una mayor retención de agua. En los análogos de queso no se evaluó el rendimiento ya que las condiciones de proceso no conllevan una pérdida de producto durante la elaboración.

Las propiedades de textura también se vieron afectadas por la incorporación de la *MTGasa* al proceso de producción de los quesos. En cuanto a los de coagulación ácida, se obtuvo un incremento en la dureza de los quesos tratados bajo cualquier dosis de enzima aplicada, aunque se comprobó que la dosis óptima de enzima sería de $0.4 \text{ g de MTG} \cdot \text{L}^{-1}$, a partir de la cual se obtendría un retroceso en las mejoras obtenidas tanto en la textura del queso como también en otros parámetros. Por el contrario, los quesos de coagulación enzimática presentaron una disminución en la dureza en comparación con los quesos Control, probablemente debido a que la mayor retención de agua no se acompañó de una mejora en la recuperación de proteína. En

ambos tipos de queso, las micrografías SEM estuvieron en sintonía con los cambios observados en las propiedades de textura y de composición química debido al tratamiento con *MTGasa*. En todos los casos, los efectos de la adición de la *MTGasa* mencionados, se vieron corroborados por modificaciones en los perfiles electroforéticos SDS-PAGE de los quesos tratados, en los cuales se evidenció la formación de polímeros de alto peso molecular debido al entrecruzamiento de las proteínas por acción de la *MTGasa*. Por lo tanto, se puede concluir que la aplicación de *MTGasa* en la elaboración de quesos frescos tanto de coagulación ácida como enzimática tuvo un impacto positivo en el rendimiento quesero y en las características del producto final gracias a la mejora en la microestructura del queso como consecuencia de la actividad polimerizadora de la enzima.

En cuanto a los análogos de queso fresco de coagulación enzimática elaborados tanto con CHY-MAX como con Fromase, los efectos beneficiosos del tratamiento con *MTGasa* sobre las características del producto final fueron menos evidentes a pesar de que las reacciones de entrecruzamiento entre proteínas lácteas por acción de la *MTGasa* se observaron claramente en los perfiles electroforéticos correspondientes. Aun así, para ambos cuajos, permitió mejorar su textura. En cuanto a la sinéresis, se vio reducida solo en los análogos elaborados con CHY-MAX. Sin embargo, a pesar de haberse presentado una mejora en los análogos experimentales de queso de Burgos, las características resultantes distan de las típicas y deseadas por los consumidores en un queso de coagulación enzimática. Probablemente, una mejora en las condiciones de procesado, sobre todo relacionadas con la etapa de homogeneización de los ingredientes lácteos, pueda traducirse en un mayor impacto del tratamiento con *MTGasa* en ese tipo de productos.

Les propietats nutricionals i sensorials han fet del formatge un producte fortament consumit a escala mundial. El fet de facilitar la conservació dels components de la llet en la seva matriu, va suposar la introducció del formatge en la dieta humana, i amb el temps se n'han desenvolupat una gran quantitat de varietats, amb diversos flavors i textures, determinades a més pels costums i cultures de les diferents regions del món. Això ha portat a un increment important en el seu consum des de finals del segle passat, així com a la cerca de noves eines que permetin optimitzar la producció formatgera i, al mateix temps, donar solució a un important problema mediambiental provocat per l'errònia gestió final del sèrum de la llet, amb una gran càrrega de matèria orgànica, que resulta de l'elaboració del formatge i que ha anat en augment amb l'expansió de la indústria formatgera mundial. Amb els recents avenços en el camp de la biotecnologia i la recerca d'alternatives que permetin optimitzar els processos de la indústria alimentària, la Transglutaminasa Microbiana (*MTGasa*) ha suposat un enfoc nou, amb un gran potencial per al desenvolupament de nous productes i per a la millora de la qualitat i la funcionalitat dels ja existents. La seva capacitat per catalitzar reaccions de transferència de grups acil entre el grup γ -carboxamida de residus de glutamina presents en pèptids i proteïnes, i una varietat d'amines primàries, permeten la formació de diferents productes en funció de les molècules involucrades. De les tres reaccions principals que pot catalitzar la *MTGasa*, la de major interès per a la seva aplicació en el sector alimentari és la de polimerització de proteïnes, el que pot provocar canvis importants en el comportament de macromolècules de la matriu alimentària.

En la llet, les proteïnes susceptibles de ser tractades amb *MTGasa* son les proteïnes sèriques i les caseïnes. Aquestes últimes constitueixen un excel·lent substrat per a l'enzim, degut a que quasi no tenen estructura secundària, el que facilita l'accés als residus aminoacídics de la proteïna implicats en la reacció enzimàtica, fent-la més vulnerable a l'acció de la *MTGasa*. En contrast, la naturalesa globular de les proteïnes sèriques fa que tendeixin a ser substrats menys reactius amb l'enzim, arribant a interaccionar únicament en condicions que afavoreixin el seu desplegament total o parcial. Estudis sobre l'aplicació de la *MTGasa* en formatges indiquen que el tractament amb aquest enzim permetria incrementar el rendiment de la quallada i millorar algunes de les seves característiques. En aquest sentit, l'objectiu d'aquesta tesi doctoral va ser avaluar l'aplicació de la *MTGasa* produïda per BDF Natural Ingredients en l'elaboració de

formatges frescos tant de coagulació àcida com enzimàtica i d'un anàleg de formatge, a partir dels seus efectes en el rendiment formatger i en la qualitat del producte final, bàsicament quant a composició química i textura, agafant com a referència el tractament sense *MTGasa*. Els perfils electroforètics de la fracció caseínica dels formatges juntament amb la seva microestructura es varen avaluar amb la finalitat d'analitzar la implicació de l'enzim en els canvis observats.

El tractament enzimàtic amb *MTGasa* dels formatges frescos va permetre l'obtenció de valors de rendiment superiors, en comparació amb els tractaments Control. En el cas dels formatges de coagulació àcida, es va incrementar el rendiment en una relació depenent de la concentració de *MTGasa* aplicada en el rang assajat, arribant a valors de fins a un 19% d'increment respecte del Control. Aquest increment es va donar gràcies a una major retenció d'aigua i a la menor pèrdua de proteïnes associades a la fracció de fins. Això es va traduir, a més, en l'obtenció de formatges amb una qualitat nutritiva millor, degut al seu major contingut en proteïna, encara que tant pel que fa a la composició com per a la majoria dels altres paràmetres analitzats, la sobredosificació de l'enzim comporta una pèrdua de part de les millores obtingudes. En els formatges de coagulació enzimàtica, l'efecte de la *MTGasa* va ser avaluat segons el moment d'addició de la *MTGasa* durant el procés de producció (prèviament o conjuntament a l'addició de l'agent coagulant) i per a tres tipus de qualls diferents. Per a tots ells, el tractament amb *MTGasa* també va incrementar el rendiment respecte del Control, sense importar el moment d'addició; tampoc es va observar un patró de comportament diferent en funció del tipus de quall emprat. En aquest cas, l'increment en el rendiment va ser degut exclusivament a una major retenció d'aigua. En els anàlegs de formatge no es va avaluar el rendiment ja que les condicions de procés no comporten una pèrdua de producte durant la seva elaboració.

Les propietats de textura també es varen veure afectades per la incorporació de la *MTGasa* al procés de producció dels formatges. Quant als de coagulació àcida, es va obtenir un augment en la duresa dels formatges tractats, a qualsevol de les concentracions d'enzim aplicades, encara que es va comprovar que la dosi d'enzim òptima seria de 0.4 g de MTG·L⁻¹, a partir de la qual s'obtidria un efecte advers sobre la textura del formatge. Els de coagulació enzimàtica varen presentar una disminució dels valors de fermesa en comparació als formatges Control. En ambdós tipus de formatge, les micrografies SEM es van mostrar en sintonia amb els canvis observats en les propietats texturals i de composició degut al tractament amb *MTGasa*. En tots els casos, els efectes de l'addició de la *MTGasa* mencionats, es varen veure corroborats per

modificacions en els perfils electroforètics SDS-PAGE dels formatges tractats, en els quals es va evidenciar la formació de polímers d'elevat pes molecular degut a l'entrecreuament de les proteïnes per acció de la *MTGasa*. Per tant, es pot concloure que l'aplicació de *MTGasa* en l'elaboració de formatges frescos tant de coagulació àcida com enzimàtica va tenir un impacte positiu en el rendiment formatger i en les característiques del producte final gràcies a la millora en la microestructura com a conseqüència de l'activitat polimeritzadora de l'enzim.

Quant als anàlegs de formatge fresc de coagulació enzimàtica elaborats tant amb CHY-MAX com amb Fromase, els efectes beneficiosos del tractament amb *MTGasa* sobre les característiques del producte final varen ser menys evidents, malgrat que les reaccions d'entrecreuament entre proteïnes làcties per acció de la *MTGasa* es varen observar clarament en els perfils electroforètics corresponents. Malgrat tot, per a ambdós qualls, va ser possible millorar la textura dels anàlegs amb l'ajut de la *MTGasa*. Pel que fa a la sinèresi, aquesta es va veure reduïda només en els anàlegs amb CHY-MAX com a conseqüència de l'acció de la *MTGasa*. Tanmateix, tot i haver-se obtingut una millora en els anàlegs experimentals de formatge tipus Burgos, les característiques resultants disten de les típiques i desitjables pels consumidors d'aquest tipus de producte. Probablement, una millora en les condicions de processat, sobretot relacionades amb l'etapa d'homogeneïtzació dels ingredients lactis, pugui traduir-se en un major impacte del tractament amb *MTGasa* en aquest tipus de productes.

ABSTRACT

Cheeses, with their nutritional and sensory properties, have become a highly consumed product worldwide. The ability to preserve milk components in its matrix facilitated the introduction of cheese in the human diet. Over the years, influenced by the traditions and cultures from different regions around the world, a great amount of varieties has been developed, with diverse flavors and textures, which led to a significant increase in consumption. Concurrently, research efforts have focused on developing new tools and techniques to optimize cheese production, as well as, to address an important environmental problem caused by the incorrect final disposal of whey as a cheese production process by-product. In search for the alternatives to optimize the processes of the food industry, along with the recent advances in biotechnology, Microbial Transglutaminase (*MTGase*) have emerged as a novel approach, with great potential for the development of new products and improvement of the quality and functionality of the existing ones. Its ability to catalyze acyl group transfer reactions between the γ -carboxamide group of glutamine residues present in peptides and proteins, and a variety of primary amines, allow the formation of different products depending on the molecules involved. Of the three main reactions that can be catalyzed by *MTGase*, the one with the greatest impact for its application in the food sector is protein cross-linking, as it can cause important changes in the behaviour of the macromolecules of the food matrix.

In milk, the proteins susceptible to being treated with *MTGase* are the serum proteins and the caseins. The latter constitute an excellent substrate for the enzyme, because they have almost no secondary structure. This facilitates access to amino acid residues of the protein involved in the enzymatic reaction, making it more vulnerable to the action of *MTGase*. In contrast, the globular nature of the serum proteins tends to make them less reactive substrates with the enzyme, interacting only under conditions that favour their total or partial denaturation. Studies on the application of *MTGase* in cheeses indicate that the treatment with this enzyme would allow to increase the yield of the curd and improve some of its characteristics. In this sense, the objective of this doctoral thesis was to evaluate the application of *MTGase*, produced by the company BDF Natural Ingredients, in the manufacture of fresh cheeses (acid coagulation, enzymatic and an analogous cheese), in terms of its effects on the cheese yield and on the quality of the final product (chemical composition and texture), taking the treatment without *MTGase* as a reference. The electrophoretic profiles of the caseinic fraction of the cheeses, together with

their microstructure, were evaluated in order to analyze the enzyme's involvement in the observed changes.

The enzymatic treatment with *MTGase* of the fresh cheeses, allowed higher yield values to be obtained in comparison with the Control samples. In the case of acid coagulation cheeses, the yield was increased in a ratio dependent on the *MTGase* concentration applied in the tested range, reaching values of up to 19% compared to the Control. This increase was due to higher water retention and a lower loss of proteins associated with the fines fraction. This also translated into obtaining more nutritious cheeses, due to a higher protein content, although both in the composition and in most parameters analysed, an overdose of the enzyme leads to a regression in the improvements obtained. In enzymatic coagulation cheeses, the effect of *MTGase* was evaluated according to the time of addition of the enzyme during the production process (prior or together with the addition of the coagulating agent) and for three different rennet types. For all of them, treatment with *MTGase* also increased the yield with respect to the Control, regardless when the addition was made; nor was a different pattern of behaviour observed, depending on the type of rennet used. In this case, the increase in yield was solely due to higher water retention. Cheese performance was not evaluated in cheese analogues since the process conditions do not lead to a loss of product during processing.

The texture properties were also affected by the incorporation of *MTGase* into the cheese production process. As for acid coagulation, an increase in the hardness of the cheeses treated under any applied enzyme dose was obtained, although it was found that the optimal enzyme dose would be 0.4 g of MTG·L⁻¹, after which an adverse effect on cheese texture was noted. Those cheeses with enzymatic coagulation showed less firmness when compared to the Control cheeses. In both types of cheese, the SEM micrographs were in line with the changes observed with respect to the properties of texture and chemical composition due to *MTGase* treatment. In all cases, the effects of the abovementioned *MTGase* addition were corroborated by modifications in the SDS-PAGE electrophoretic profiles of the treated cheeses, in which the formation of high molecular weight polymers was proven due to the cross-linking of the proteins by the action of *MTGase*. It can therefore be concluded that the application of *MTGase* in the production of fresh acid and enzymatic coagulation cheeses, as well as in an analogous cheese, had a positive impact both on the cheese yield and on the characteristics of the final product,

due to the improvement in the microstructure of the cheese as a result of the polymerization activity of the enzyme.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de desarrollar un proyecto que facilitara la conexión entre la universidad y la industria, se planteó la posibilidad de realizar la tesis doctoral en un contexto empresarial donde aplicar la biotecnología en la búsqueda de soluciones a cuestiones y necesidades de la industria alimentaria, ante los desafíos de la situación global actual. Por esta razón, se suscribió un proyecto de Doctorado Industrial en la empresa BDF Natural Ingredients SL (BDF) en colaboración con la Universitat de Girona, que favoreciera una sólida relación entre ambas partes, mediante el intercambio y la transferencia de conocimiento. Dicha empresa está especializada en la investigación, fabricación y comercialización de la enzima transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) destinada al sector de la alimentación, y en los últimos años se ha posicionado como una de las empresas líderes del sector en ofrecer soluciones a base de la enzima, a través de la serie de productos BDF PROBIND®. Se trata de formulaciones funcionales a base de la *MTGasa*, con diversas aplicaciones en los sectores cárnico, de pescado, lácteo y de panificación que se distribuyen en más de 50 países del mundo, estando presente en la mayor parte de los mercados globales.

Actualmente pueden encontrarse en el mercado preparaciones enzimáticas que contienen *MTGasa* obtenida mediante biosíntesis producidas por distintas empresas. Sin embargo, esto es un hecho relativamente reciente dado que, hasta finales de la primera década del siglo XXI, la patente para la producción de dicha enzima microbiana estaba en manos de la empresa japonesa Ajinomoto®. La liberación de esta patente y los avances que su uso ha traído al sector alimentario debido a la importancia de su aplicación, han llevado a la existencia de un mercado global de la *MTGasa*, con una demanda en crecimiento y con la consecuente creación de diversas empresas que la producen y/o comercializan, generando una fuerte competencia en el sector y forzando a las empresas a buscar estrategias para mejorar su competitividad a través de la optimización de la producción de la enzima, mejorando sus propiedades, desarrollando formulaciones innovadoras y/o explorando nuevos campos de aplicación más allá de las

posibilidades consideradas hasta el momento, sobre todo pensando en un uso eficiente de los recursos.

1.1 Contexto de la problemática global

Para mediados de 2015 la población mundial alcanzó los 7.3 mil millones, según se indica en el documento *World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables* elaborado por la *Population Division* del *Department of Economic and Social Affairs* de las *United Nations*, lo que implica un aumento de aproximadamente mil millones de personas en los doce años anteriores. En los siguientes 15 años, está previsto un aumento global de la población de más de mil millones, alcanzando los 8.5 mil millones en 2030, 9.7 mil millones en 2050 y para 2100 está pronosticado que llegue a los 11.2 mil millones (Naciones Unidas, 2015b).

De acuerdo con el Foro de Expertos de Alto Nivel de la FAO, a pesar de que la tasa de crecimiento de la población será inferior a la registrada en las últimas décadas, incluso en 2050 la escasez económica, la penuria y la desnutrición continuarán estando muy extendidas; y la demanda de otros productos alimenticios más sensibles al aumento de los ingresos en los países en desarrollo, como los lácteos y productos pecuarios, se incrementará más rápidamente que la de otros, como los cereales. Las proyecciones de la FAO muestran que, para alimentar una población mundial de la magnitud mencionada, sería necesario aumentar la producción de alimentos en un 70% entre 2005 y 2050 (FAO, 2009). Sin embargo, las mismas proyecciones indican que el aumento de la producción por sí solo no sería suficiente para garantizar la seguridad alimentaria para todos. Las últimas estimaciones de la FAO indican que el número de personas subalimentadas en el mundo aumentó de 777 millones en 2015 a 815 millones en 2016 (FAO y OPS, 2017). Las malas prácticas de cosecha y transporte, así como el desperdicio de alimentos han contribuido a la escasez. Esto provoca que cada año un tercio de todos los alimentos producidos - equivalentes a 1300 millones de toneladas por un valor de alrededor de 1 billón de dólares - termine pudriéndose en los contenedores de consumidores y minoristas (Naciones Unidas, 2015a). Lo que demuestra la necesidad de utilizar los recursos limitados de una forma más sostenible, reduciendo de esta forma el riesgo de escasez e inestabilidad en diversas regiones del mundo, y manteniendo los impactos ambientales dentro de los límites naturales del planeta.

La Unión Europea ha abordado como eje fundamental de su Estrategia Europa 2020 la utilización eficiente de los recursos a lo largo de todo su ciclo de vida, desde la fase de extracción hasta la eliminación, para generar crecimiento y empleo en los próximos años, propiciando un crecimiento económico inteligente, sostenible e integrador. En la hoja de ruta de dicha iniciativa se incluyen los cambios tecnológicos y estructurales necesarios, con objetivos a cumplir para 2020 y se recomienda, entre otros aspectos, perfeccionar las tecnologías ya existentes, para llevar a cabo la transición a un desarrollo más sostenible (Unión Europea, 2011).

Al respecto, la biotecnología se ha constituido como fuente de importantes herramientas que ayudarían a mejorar la situación alimentaria mundial interviniendo en las diferentes etapas de producción, proporcionando además importantes oportunidades para el progreso en diversos ámbitos, muchos de los cuales hacen parte de los Objetivos de Desarrollo Sostenible planteados por la ONU e incluidos en su Agenda 2030 sobre Desarrollo Sostenible (Naciones Unidas, 2015a). En el sector agrícola, las innovaciones biotecnológicas están al mismo tiempo incrementando los suministros de alimentos, reduciendo el daño medioambiental, conservando los recursos naturales y aumentando los ingresos agrícolas en las diferentes economías alrededor del mundo (Lokko *et al.*, 2018). En el mismo sentido, la tecnología enzimática ofrece un gran potencial para que tanto las comunidades, como diversas industrias, puedan enfrentar los desafíos venideros que trae consigo la situación mundial actual.

La biocatálisis enzimática es una parte fundamental de la biotecnología, que cuenta con una amplia aplicación industrial. Las enzimas presentes en la naturaleza se han utilizado desde la antigüedad en la producción de alimentos como queso, masa fermentada, vino y de productos como el cuero y el lino; todo ello favorecido por el crecimiento espontáneo de microorganismos o por enzimas producidas por ellos, o presentes en preparaciones como el rumen de los terneros o la papaya (Kirk *et al.*, 2002). Actualmente se emplean para producir diversos alimentos, entre ellos lácteos, productos de panadería, bebidas y elaboración de cerveza, grasas y aceites, carne y alimentos funcionales. Además de su uso como coadyuvantes de procesamiento, las enzimas también están presentes de forma natural en los alimentos, donde provocan efectos deseables como la maduración y generación de sabores y la modificación de la textura de los alimentos, e indeseables como la rancidez y el pardeamiento en frutas, vegetales y crustáceos crudos.

En el momento hay una gran cantidad de productos enzimáticos diferentes utilizados en el procesamiento de alimentos, y la cantidad aumenta con el descubrimiento de enzimas alimentarias más novedosas (Zhang *et al.*, 2018). Según Lokko *et al.* (2018), en 2013 el mercado mundial de enzimas industriales se valoró en poco más de 4 mil millones de USD y se espera que alcance alrededor de 7.1 mil millones de USD en 2018, con una tasa de crecimiento anual compuesto del 8.2%. La industria enzimática tal y como se conoce actualmente, y su crecimiento constante, son el resultado del rápido desarrollo ocurrido en las últimas décadas, debido a la mejora de las tecnologías de producción, las propiedades de las enzimas diseñadas y los nuevos campos de aplicación. Los avances recientes en genómica, metagenómica, proteómica, sistemas de expresión eficientes y nuevas técnicas de ADN recombinante han facilitado el descubrimiento de nuevas enzimas microbianas de la naturaleza, su producción y/o el desarrollo de enzimas con propiedades catalíticas mejoradas respecto a las enzimas nativas (Adrio y Demain, 2014).

Gracias a la evolución tecnológica, ha sido posible la fabricación de enzimas como preparados puros y caracterizados, la introducción de estas en productos y procesos industriales de manera habitual, así como la comercialización de enzimas que anteriormente no podían producirse (Kirk *et al.*, 2002; Iyer y Ananthanarayan, 2008). Las propiedades únicas de las enzimas permiten que los procesos asistidos por estas en la industria puedan funcionar en condiciones de reacción más suaves, con mejores rendimientos y disminución de la generación de desechos, como indican Adrio y Demain (2014). Sin embargo, la mayoría de los procesos industriales actuales se realizan todavía en condiciones bastante extremas de temperatura, acidez o alcalinidad, y/o elevada salinidad, las cuales pueden afectar la integridad física de las enzimas. Actualmente, uno de los retos más importantes es producir enzimas capaces de resistir condiciones más duras a aquellas que son habituales en nuestro entorno.

La mayoría de las enzimas tradicionales utilizadas en el procesamiento de alimentos se consideran "naturales" y biodegradables, y su uso se acompaña de resultados más ecológicos y menores impactos ambientales. Las reacciones enzimáticas son selectivas, reproducibles, rápidas, eficientes y prácticamente carecen de subproductos indeseables. Por lo tanto, las enzimas se han convertido en herramientas importantes para diversos mercados, como la alimentación animal y humana, los biocombustibles, los detergentes, los textiles, la pulpa y el papel, entre otros (Zhang *et al.*, 2018).

Las enzimas industriales, de acuerdo con su aplicación, se agrupan en enzimas detergentes, enzimas técnicas, enzimas alimentarias y enzimas de alimentación animal. Dentro del grupo de enzimas alimentarias, las utilizadas en el sector lácteo dominan el mercado (Lokko *et al.*, 2018). A pesar de que el consumo mayoritario de enzimas industriales recae actualmente en los países industrializados, el aumento del ingreso *per cápita* en países en desarrollo generará una mayor demanda de carne y lácteos, impulsando el consumo de enzimas para los sectores de piensos y de alimentación (Lokko *et al.*, 2018). En este último, el procesamiento enzimático permite el desarrollo de nuevas aplicaciones en alimentos tales como la producción de alimentos ricos en nutrientes, productos alimenticios con textura mejorada, la extracción de compuestos bioactivos y la reducción de los riesgos de seguridad de los alimentos, en donde la tendencia es contar con enzimas más específicas, estables y eficientes, y de fácil control para la producción de alimentos (Zhang *et al.*, 2018).

También es de gran interés la utilización de enzimas para minimizar el impacto ambiental asociado a la actividad industrial de las empresas agroalimentarias. En este contexto, el uso de transglutaminasas (*TGasas*) con el fin de obtener reestructurados, ya sea a partir de retales y/o de piezas de bajo valor comercial, tanto de carne como de pescado, conlleva no solo una menor generación de residuos sino también un aumento de los beneficios económicos. Además, se trata de enzimas bastante versátiles que también se emplean frecuentemente para mejorar la textura, apariencia, firmeza y vida útil en productos cárnicos, mejorar la calidad y textura en lácteos, y aumentar el volumen en productos panificados. También pueden utilizarse para aumentar el valor biológico de proteínas alimentarias, gracias a su capacidad para reaccionar con algunos aminoácidos esenciales limitantes. Por otro lado, su uso también se ha visto extendido considerablemente a otros sectores como la biomedicina (Zhang *et al.*, 2018). En este sentido, gracias a su capacidad para conjugar proteínas y péptidos con otras moléculas, actualmente hay muchos estudios centrados en aplicaciones terapéuticas, como puede ser la conjugación de fármacos con anticuerpos (Strop, 2014).

1.2 Transglutaminasas (*TGasas*)

Las transglutaminasas (*TGasas*) (EC 2.3.2.13, proteína-glutamina γ -glutamyltransferasas) son una amplia familia de enzimas multifuncionales que catalizan la transferencia de un grupo acilo entre

el grupo γ -carboxamida de residuos de glutamina (Gln) presentes en péptidos y proteínas (dador de acilo) y aminas primarias (aceptor de acilo), resultando en la formación de diferentes productos en función de las moléculas involucradas, aunque en ausencia de estas últimas pueden reaccionar con una molécula de agua. La Figura 1.1 muestra los tres principales tipos de reacción que llevan a cabo las transglutaminasas (Folk y Chung, 1973; Lorand y Conrad, 1984; Motoki y Seguro, 1998):

- de entrecruzamiento o polimerización (*cross-linking*) gracias a un enlace isopeptídico, cuando el aceptor de acilo es el grupo ϵ -amino de un residuo de lisina (Lys) ligado a una proteína;
- de transferencia de acilo, cuando el aceptor de acilo es una amina primaria formando conjugados proteína-amina; y
- de desamidación de residuos de Gln cuando, en ausencia de aminas primarias, el agua cumple la función de aceptor de grupos acilo y, de esta manera, convirtiendo los residuos de Gln en residuos de ácido glutámico.

Como se puede observar en la misma figura, cualquiera de estas reacciones conduce a la producción de amoníaco (Mariniello *et al.*, 2008).

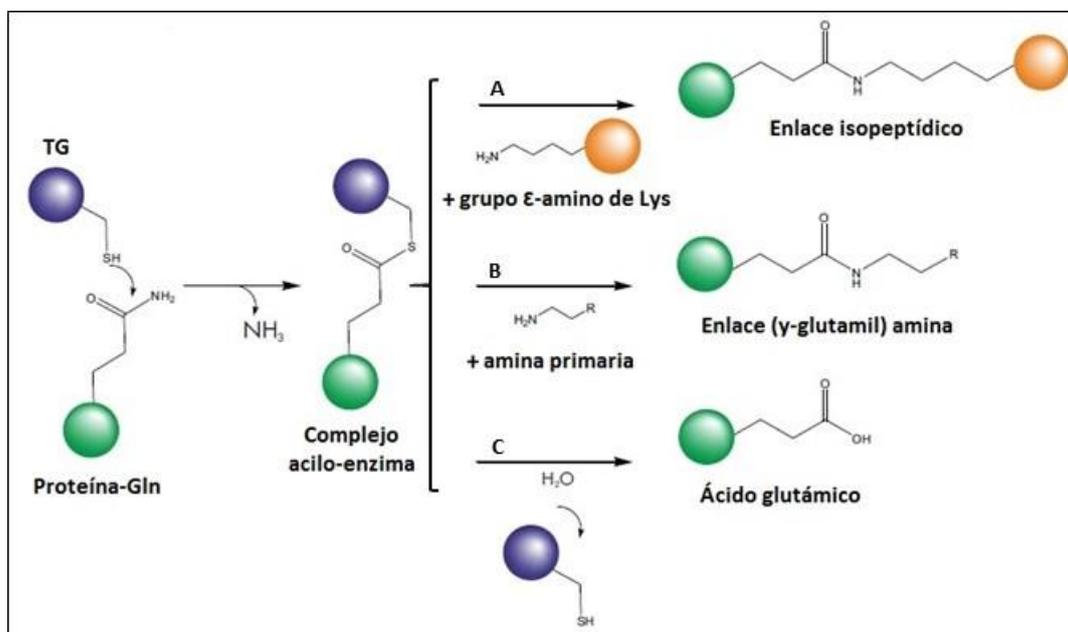


Figura 1.1. Principales reacciones catalizadas por las transglutaminasas: A) reacción de polimerización; B) reacción de transferencia de un grupo acilo; y C) reacción de desamidación. Modificada de: <https://zedira.com/Assays-and-substrates>

Además, se ha descrito que, al menos algunos tipos de *TGasas*, pueden llevar a cabo reacciones de esterificación cuando alcoholes actúan como aceptores de grupos acilo (Nemes *et al.*, 1999). Incluso se ha sugerido que algunas (como el FXIIIa y la TG2) poseen actividad isopeptidasa (Parameswaran *et al.*, 1997; Király *et al.*, 2016), es decir, son capaces de hidrolizar los isopéptidos ϵ -(γ -glutamil)lisina, aunque esta reacción no conlleva la generación de amoníaco. A pesar de las grandes diferencias estructurales que se han detectado entre *TGasas* de distintos orígenes, el mecanismo catalítico es muy similar para todas las *TGasas* activas, con un centro catalítico formado en la mayoría de los casos por una tríada constituida por una cisteína (Cys), una histidina (His) y, de manera menos obligatoria, un residuo de aspartato (Asp) o asparagina (Asn), aunque la esencialidad de estos aminoácidos también depende del tipo de *TGasa* (Kashiwagi *et al.*, 2002). Sin embargo, para todas ellas la Cys juega un papel central en la reacción de transferencia del grupo acilo (Kanaji *et al.*, 1993; Wada *et al.*, 2002; Beninati y Piacentini, 2004).

La reacción de transferencia del grupo acilo procede de acuerdo con un mecanismo de reacción ping-pong modificada (Folk, 1969), también llamado de doble desplazamiento, muy frecuente en reacciones enzimáticas en las que participan dos sustratos de manera secuencial. Se ha propuesto que en el caso de las *TGasas*, el grupo γ -carboxamida de un residuo de Gln reacciona con la Cys que forma parte de la tríada catalítica del centro activo para formar un compuesto intermediario relativamente estable, tipo tioéster, y liberando amonio; este compuesto intermediario reacciona posteriormente con el segundo sustrato, una amina primaria para la formación de la unión amida o en su ausencia, una molécula de agua, produciéndose la hidrólisis del intermediario acilo-enzima y conllevando la desaminación del residuo de Gln.

Los primeros en hacer referencia a las *TGasas* fueron Heirinch Waelsch y sus colaboradores (Sarkar *et al.*, 1957), cuando encontraron una enzima capaz de incorporar aminas primarias a proteínas, cuya actividad era Ca^{2+} -dependiente; dicha enzima fue detectada en distintos extractos tisulares de origen animal, aunque con distintos niveles de actividad, siendo especialmente elevada en el hígado de cobayas. Unos años después, Folk y Cole (1965, 1966) estudiaron las reacciones de transferencia e hidrólisis catalizadas por esta enzima, así como los requerimientos estructurales de determinados sustratos de la misma.

Posteriormente se observó que las *TGasas* se encuentran ampliamente distribuidas en una gran variedad de organismos vivos, incluyendo mamíferos, otros vertebrados, invertebrados, plantas y microorganismos (Beninati y Piacentini, 2004), realizando una gran variedad de funciones distintas. En humanos se han reconocido 9 genes de *TGasas*, codificando para 8 formas enzimáticamente activas (Factor XIIIa y TG1-TG7) y una inactiva (*Erythrocyte membrane Protein Band 4.2* o EPB42) debido a la sustitución de la Cys del centro activo por una alanina (Beninati y Piacentini, 2004), aunque solo 6 enzimas han sido aisladas y caracterizadas hasta el nivel de proteína. Todas ellas tienen en común que se trata de proteínas multi-dominio, el requerimiento de Ca^{2+} para su actividad y que son monoméricas, excepto el Factor XIIIa de la sangre, involucrada en el proceso de coagulación y la única que funciona como dímero (Demény *et al.*, 2015). Destacan especialmente, además del Factor XIIIa, las TG1 y TG3, presentes en células epiteliales diferenciadas terminalmente; la TG4, una enzima de la glándula prostática, asociada con procesos reproductivos en mamíferos (Esposito y Caputo, 2005; Wu y Tsai, 2006); y la TG2, una de las formas más estudiadas en la actualidad, con actividad Ca^{2+} -dependiente e involucrada en diversos procesos biológicos como endocitosis, ensamblaje de la matriz celular, apoptosis y procesos adhesivos celulares (Autuori *et al.*, 1998; Chen y Mehta, 1999; Abe *et al.*, 2000; Rachel y Pelletier, 2013), y desde el punto de vista médico ampliamente estudiada para identificar su papel en enfermedades como la formación de cataratas, la celiaquía y la psoriasis (Rachel y Pelletier, 2013).

Como puede observarse en la Tabla 1.1, los mecanismos que controlan la actividad de estas *TGasas* dependen de su origen e incluyen, además del requerimiento de Ca^{2+} , el corte proteolítico para su activación, tanto en el caso del Factor XIII del sistema de coagulación de la sangre (forma activa: Factor XIIIa), como de las TG3, TG5 y TG6, debido a ser sintetizadas como zimógenos inactivos (Takahashi *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1990; Ahvazi y Steinert, 2003; Pietroni *et al.*, 2008; Muszbek *et al.*, 2011; Eckert *et al.*, 2014); la inhibición de la actividad de transamidación por parte del guanosín trifosfato (GTP) en el caso de las transglutaminasas TG2, TG3, TG5 y TG6 (Achyuthan y Greenberg, 1987; Aeschlimann y Paulsson, 1994; Candi *et al.*, 2004; Klöck y Khosla, 2012; Thomas *et al.*, 2013); la TG3 siendo también inhibida por Mg^{2+} como sucede con la TG1 (Ahvazi *et al.*, 2004; Boeshans *et al.*, 2007) y, en todos los casos, debido a que su unión es antagónica a la del Ca^{2+} .

En el grupo de los vertebrados se han aislado *TGasas* también de distintas especies de peces, las cuales presentan una gran semejanza estructural con las de los mamíferos (Yasueda *et al.*, 1995; Sano *et al.*, 1996); de algunos anfibios, como ranas y sapos (Alibardi *et al.*, 2004b); de reptiles, como tortugas (Alibardi *et al.*, 2004a); y de aves, incluyendo el pollo (Bures y Goldsmith, 1978). Algunos ejemplos de su presencia en invertebrados incluyen saltamontes (Singer *et al.*, 1992), la cacerolita de mar (Tokunaga *et al.*, 1993), las ascidias (Cariello *et al.*, 1997), el cangrejo de río (Wang *et al.*, 2001), la estrella de mar (Sugino *et al.*, 2002), la mosca de la fruta (Li *et al.*, 2002; Lindgren *et al.*, 2008) y el camarón tigre (Huang *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005).

Tabla 1.1. Características de las *TGasas* presentes en mamíferos (extraída y modificada de Komáromi *et al.*, 2010)

<i>TGasa</i>	Activación	Localización	Estructura	Masa molecular por monómero (Da)
p-F XIII (plasmático)	Trombina + Ca ²⁺	Plasma	Tetrámero (A ₂ B ₂)	A: 83 136 B: 73 207 (sin ¹ CH)
c-F XIII (citoplasmático)	Ca ²⁺	Plaquetas, monocitos, macrófagos	Dímero (A ₂)	
TG1	Proteólisis + Ca ²⁺	Queratinocitos	Monómero	² 89 656
TG2	Ca ²⁺	Ubicua	Monómero	77 198
TG3	Proteólisis + Ca ²⁺	Queratinocitos, folículos capilares	Monómero	76 501
TG4	Ca ²⁺ + ácido fosfatídico	Glándula prostática	Monómero	77 014
TG5	³ Proteólisis + Ca ²⁺	Queratinocitos, folículos capilares	Monómero	80 647
TG6	⁴ Proteólisis + ⁵ Ca ²⁺	Testículos, pulmones, ⁴ cerebro	Monómero	79 181
TG7	⁶ ND	Testículos, pulmones, ⁴ cerebro	Monómero	79 810
Banda 4.2	Inactiva	Eritrocitos	Monómero	76 878

¹CH: carbohidrato; ²: modificación post-síntesis por acilación en el extremo N-terminal, siendo el peso molecular final aproximadamente de 106 kDa; ³Pietroni *et al.* (2008); ⁴Eckert *et al.* (2014); ⁵Thomas *et al.* (2013); ⁶ND: no determinado

También se ha detectado la presencia de *TGasas* en distintos órganos de plantas (Serafini-Francassini *et al.*, 1995), aunque han sido menos estudiadas en profundidad debido principalmente a la complejidad de su purificación. Aparentemente presentan características

similares a las *TGasas* animales, a pesar de contar con una baja homología en aminoácidos (Luciano y Arntfield, 2012). Sin embargo, algunas de ellas son Ca^{2+} -independientes (Kobayashi *et al.*, 1998b). Las primeras evidencias de la presencia de actividad *TGasa* en plantas se observaron en plántulas de *Pisum sativum* (Icekson y Apelbaum, 1987) y en brotes de *Helianthus tuberosus* (Serafini-Fracassini *et al.*, 1988), pero no fue hasta el año 2004 que se caracterizaron a nivel molecular proteínas de origen vegetal con dicha actividad procedentes de *Arabidopsis thaliana* y *Zea mais* (Della Mea *et al.*, 2004; Villalobos *et al.*, 2004). Otros estudios han evidenciado su presencia en distintas partes de diversas plantas: hojas de *Beta vulgaris* L. (Signorini *et al.*, 1991); hojas de *Glycine max* (Kang y Cho, 1996); guisantes, habas, trigo y cebada (Lilley *et al.*, 1998); y hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (El-Hofi *et al.*, 2014), entre otros.

Klein *et al.* (1992) describieron la presencia de una *TGasa* en el moho mucilaginoso *Physarum polycephalum*, perteneciente al grupo Mixomycota, aunque su producción a nivel industrial se desestimó por las dificultades que conlleva trabajar con este tipo de organismos. *Pythium* y *Phytophthora*, hongos pertenecientes a la clase Oomycetes -algunos patógenos de plantas (Reiss *et al.*, 2011)-, producen transglutaminasa con un nivel de expresión muy elevado (Bech *et al.*, 2002; Brunner *et al.*, 2002). *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* también son capaces de sintetizar dicha enzima (Ruiz-Herrera *et al.*, 1995; Iranzo *et al.*, 2002).

Hasta finales de los años 80 del siglo XX, la *TGasa* obtenida a partir de hígado de cobaya era la única fuente comercial disponible de dicha enzima. Sin embargo, debido a su escasa producción y a los complejos procesos de extracción y purificación requeridos para su obtención, su precio era excesivo para su aplicación a nivel industrial, lo que hizo necesario buscar alternativas para facilitar la obtención de grandes cantidades a un precio más asequible (Cui *et al.*, 2007). Además, su actividad dependiente de Ca^{2+} la hacía poco adecuada para determinadas aplicaciones en el sector alimentario, debido a que en presencia de dicho elemento se favorece la precipitación de algunas proteínas, entre las que se incluyen las caseínas, la globulina de soja y la miosina. Esta necesidad propició el comienzo de un complejo trabajo por parte de un grupo de investigadores de las compañías japonesas Ajinomoto Co., Inc. y Amano Enzyme Inc. (previamente Amano Pharmaceutical Co., Ltd.), realizando un *screening* de 5000 microorganismos aislados de muestras de suelo procedentes de distintos lugares, que culminó con la caracterización de la primera transglutaminasa microbiana (*MTGasa*), producida por la cepa S-8112 no toxigénica y no patógena del género *Streptoverticillium*, posteriormente identificada como una variante de

Streptoverticillium mobaraense (Ando *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1995; Kuraishi *et al.*, 2001) y actualmente clasificada como *Streptomyces mobaraensis*. Debido al alto grado de semejanzas genéticas, quimiotaxonómicas y filogenéticas, el género *Streptoverticillium* fue unificado con *Streptomyces* de acuerdo con Witt y Stackebrandt (1990). Dichas empresas patentaron el procedimiento y los progresos posteriores del protocolo inicial (Santos y Torné, 2009). El objetivo era el suministro constante de una *TGasa* estable y de bajo costo para la aplicación en alimentos. La bacteria resultó ser capaz de producir la enzima mediante un proceso fermentativo tradicional secretada como zimógeno (Pasternack *et al.*, 1998) y procesada secuencialmente por dos enzimas endógenas para producir la forma activa. El hecho de ser secretada en el medio de cultivo hace innecesaria la ruptura celular, por lo que su purificación se ve facilitada y su posterior comercialización favorecida (Yokoyama *et al.*, 2004). Con el tiempo se ha demostrado que la *MTGasa* puede producirse empleando prácticamente cualquier sustrato, lo que ha llevado a intensificar la búsqueda de fuentes de carbono económicas, provenientes principalmente de subproductos o desechos industriales (Aguilar-Zárate *et al.*, 2012). Además, se han seleccionado nuevas cepas de *Streptomyces* y otros microorganismos con el objetivo de incrementar la producción de enzima y ampliar su rango de aplicaciones.

Se han aislado distintas cepas microbianas con tasas relativamente elevadas de actividad transglutaminasa de distintos géneros (Tabla 1.2), las cuales pertenecen básicamente a *Streptoverticillium*/*Streptomyces* spp -donde participaría en el desarrollo del micelio y en la diferenciación morfológica (Pasternack *et al.*, 1998)- y en especies esporuladoras del género *Bacillus* (Kobayashi *et al.*, 1998b). Si bien en el primer caso la enzima se sintetiza extracelularmente, en el segundo se produce intercelularmente durante el proceso de maduración de la espora (Ramanujam y Hageman, 1990; Mariniello *et al.*, 2008). Sin embargo, la incubación de las esporas a 37 °C y pH 10.0 facilita su recuperación debido a que se secreta en una forma soluble. Su peso molecular se encuentra alrededor de 23 kDa (Kobayashi *et al.*, 1998b). A pesar de las diferencias entre las *TGasas* de *Streptomyces* spp y de *Bacillus* spp, es importante señalar que ambas son Ca^{2+} -independientes y, al igual que sucede con las otras *TGasas* conocidas hasta el momento, en ambas el grupo -SH de una Cys participa en la reacción (Kobayashi *et al.*, 1998b).

De entre todas las cepas aisladas hasta el momento, *Streptomyces mobaraensis* es la que presenta una mayor producción y, por tanto, la isoforma que se utiliza a nivel industrial en el

sector alimentario. Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos realizados, se considera que tanto los niveles de productividad de dicha enzima como el costo de producción deben optimizarse para mejorar en términos de competitividad y así incrementar su aplicación a nivel industrial (Zhang *et al.*, 2013).

Tabla 1.2. Géneros y/o especies de microorganismos con cepas productoras de la enzima transglutaminasa (adaptada y modificada de Kieliszek y Misiewicz, 2014)

Microorganismo	Referencia
<i>Actinomadura</i> sp.	Kim <i>et al.</i> (2000)
<i>Bacillus alvei</i> (esporas)	Kobayashi <i>et al.</i> (1998b)
<i>Bacillus aneurinolyticus</i> (esporas)	Kobayashi <i>et al.</i> (1998b)
<i>Bacillus cereus</i> (esporas)	Kobayashi <i>et al.</i> (1998b)
<i>Bacillus circulans</i> (esporas)	Suzuki <i>et al.</i> (2000) De Souza <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus subtilis</i> (esporas)	Kobayashi <i>et al.</i> (1998b) Aidaros <i>et al.</i> (2011) Fernandes <i>et al.</i> (2015)
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Itaya y Kikuchi (2008)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Date <i>et al.</i> (2004)
<i>Enterobacter</i> sp	Boumeow <i>et al.</i> (2012b)
<i>Kutzneria albida</i>	Steffen <i>et al.</i> (2017)
<i>Providencia</i> sp	Boumeow <i>et al.</i> (2012b)
<i>Streptomyces</i> sp.	Alves Macedo <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptomyces mobaraensis</i>	Ando <i>et al.</i> (1989) Boumeow <i>et al.</i> (2012a)
<i>Streptomyces mobaraensis</i> Resistente a ↑ [sal]	Jin <i>et al.</i> (2016)
<i>Streptomyces platensis</i>	Lin <i>et al.</i> (2006)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Cui <i>et al.</i> (2007)
<i>Streptomyces lividans</i>	Lin <i>et al.</i> (2004, 2007)
<i>Streptomyces lydicus</i>	Boumeow <i>et al.</i> (2012)
<i>Streptomyces sioyansis</i>	Boumeow <i>et al.</i> (2012)
<i>Streptoverticillium cinnamoneum</i>	Junqua <i>et al.</i> (1997)
<i>Streptoverticillium griseocarneum</i>	Gerber <i>et al.</i> (1994)
<i>Streptoverticillium ladakanum</i>	Télliz-Luis <i>et al.</i> (2004)

Esto ha llevado a que muchos investigadores centraran su actividad en la aplicación de la tecnología recombinante para incrementar el nivel de expresión, aunque de momento sin mucho éxito debido al plegamiento incorrecto de la proteína y al requerimiento de una proteasa para eliminar el pro-dominio y así activar la enzima. *Corynebacterium* spp. y *Candida boidinii* se han modificado genéticamente con esta finalidad (Zhang *et al.*, 2013), al igual que *Escherichia coli*, ampliamente utilizada en el sector farmacéutico para la producción de proteínas recombinantes (Huang *et al.*, 2012; Rosano y Ceccarelli, 2014). Sin embargo, recientemente se ha conseguido su sobreexpresión en *E. coli* gracias a un sistema de expresión constitutivo que no requiere de una subsiguiente proteólisis (Javitt *et al.*, 2017).

1.3 Transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobaraensis* (MTGasa)

La transglutaminasa microbiana secretada por *Streptomyces mobaraensis* (MTGasa) es una proteína monomérica simple y compacta, compuesta por un único dominio y constituida por 331 aminoácidos, con un peso molecular de unos 38 kDa (Ando *et al.*, 1989; Kanaji *et al.*, 1993). Presenta una sola cisteína (Cys⁶⁴) que actúa como residuo catalítico de la enzima, la cual se encuentra suficientemente expuesta al medio externo como para permitirle reaccionar rápidamente con el sustrato (Yokoyama *et al.*, 2004), una diferencia importante en cuanto a su potencial de utilización a nivel industrial en relación con las TGasas de vertebrados y de algunos invertebrados, en las que se requiere la unión de Ca²⁺ a la enzima para la exposición de dicha Cys (Casadio *et al.*, 1999).

En 2002, Kashiwagi y su equipo determinaron la estructura tridimensional de la MTGasa de *Streptomyces mobaraensis* (Figura 1.2), completamente diferente a la de enzimas como el Factor XIII y otras TGasas presentes en vertebrados (Yee *et al.*, 1994; Noguchi *et al.*, 2001), hecho que no resulta sorprendente debido a las importantes diferencias tanto en la secuencia como en el tamaño molecular. Aunque el centro activo de la MTGasa se encuentra en una profunda hendidura, la flexibilidad estructural en los alrededores facilita la unión enzima-sustrato (Kashiwagi *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2004). A pesar de estas diferencias, el ambiente hidrofóbico y el marco estructural secundario del centro activo de la MTGasa son parecidos al de las demás TGasas, evidenciando una relación funcional entre estas enzimas (Kanaji *et al.*, 1993).

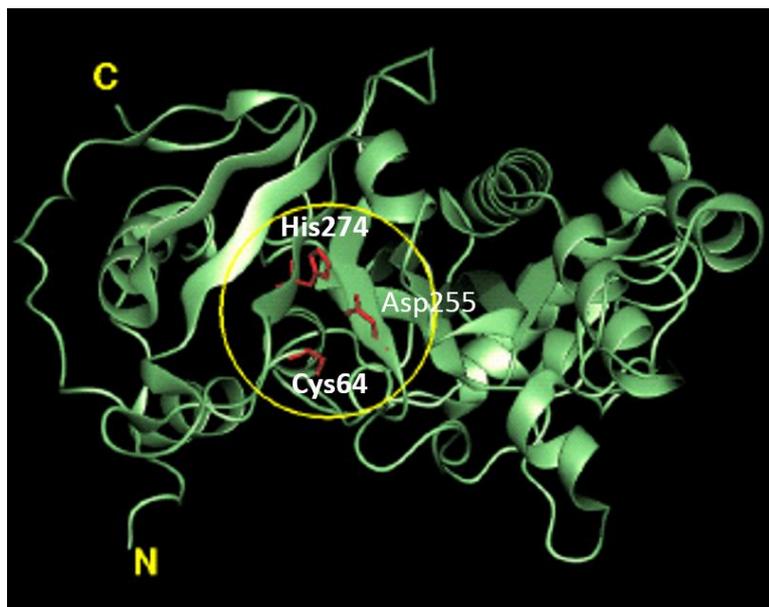


Figura 1.2. Estructura tridimensional de la *MTGasa*, mostrando la tríada catalítica Cys⁶⁴, Asp²⁵⁵ e His²⁷⁴ (Kashiwagi *et al.*, 2002)

Aun así, se considera que la *MTGasa* presenta un mecanismo catalítico novedoso para la reacción de entrecruzamiento, con una estructura que responde perfectamente a dicho mecanismo, en el cual la Asp²⁵⁵ es enzimáticamente esencial, a diferencia de lo que sucede con otras *TGasas* como puede ser el Factor XIIIa y similares en las que es la His la que comparte esencialidad en la reacción con la Cys. Según Kashiwagi *et al.* (2002), esto podría estar relacionado con el cambio de posición de estos dos aminoácidos en la tríada catalítica y la superposición entre ambos. Mientras que en el caso del Factor XIIIa y la *TGasa* derivada de pescado (FTG) consiste de Cys³¹⁴-His³⁷³-Asp³⁹⁶ y Cys²⁷²-His³³²-Asp³⁵⁵, respectivamente, en la *MTGasa* está constituida por Cys⁶⁴, Asp²⁵⁵ e His²⁷⁴ (Pedersen *et al.*, 1994; Noguchi *et al.*, 2001; Kashiwagi *et al.*, 2002), aunque algunos autores han sugerido que la His²⁷⁴ no es esencial para la actividad catalítica de manera que podría funcionar más bien como una díada Cys-Asp (Kashiwagi *et al.*, 2002). En la Figura 1.3 se muestra el hipotético mecanismo catalítico de la *MTGasa* propuesto por estos autores.

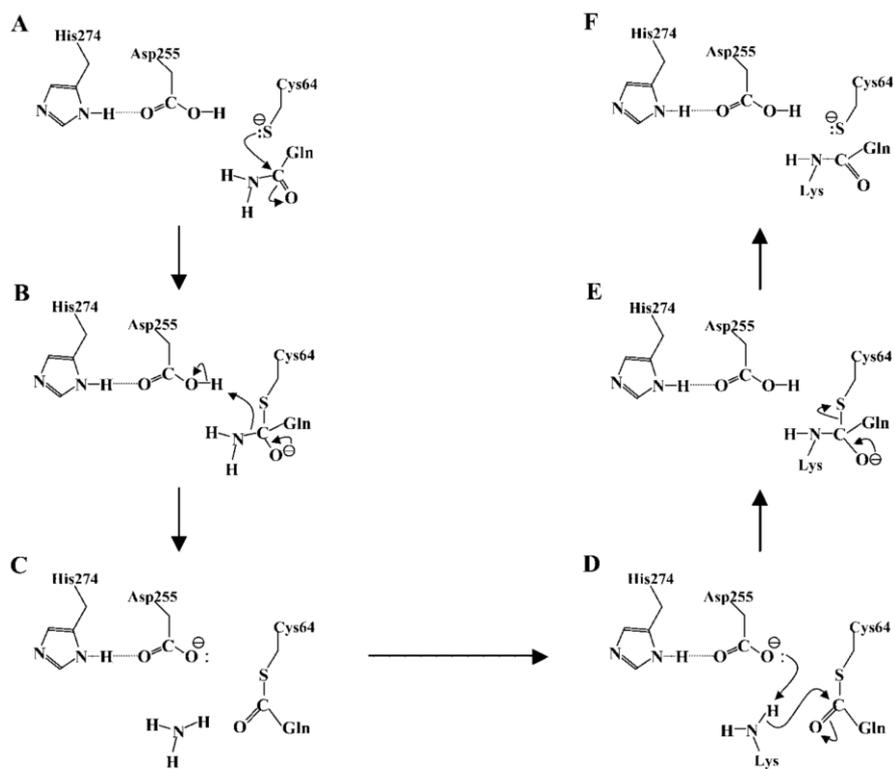


Figura 1.3. Mecanismo catalítico hipotético de la *MTGasa*, propuesto por Kashiwagi *et al.* (2002)

1.3.1 Pro-transglutaminasa

La *MTGasa* producida por *Streptomyces mobaraensis*, a diferencia de otras *TGasas* de origen microbiano (Kobayashi *et al.*, 1998a), es secretada en forma de zimógeno (pro-transglutaminasa), cuyo peso molecular es de 42.5 kDa. De acuerdo con Pasternack *et al.* (1998), para su activación se requiere la eliminación de un péptido de 45 aminoácidos que se pliega en α -hélice, adoptando una conformación en forma de L para ocupar el centro activo (Figura 1.4). Dicho péptido es responsable del relativamente bajo punto isoeléctrico del zimógeno debido a la importante presencia de aminoácidos cargados negativamente y de su mayor termoestabilidad en relación con la forma activa.

La activación de la *MTGasa* se produce gracias a dos enzimas sintetizadas por el propio microorganismo, secretadas al medio externo junto con aquella: una metaloproteasa soluble (*metaloproteasa activadora de transglutaminasa* o TAMEP, por su acrónimo en inglés), que corta a partir del extremo N-terminal, concretamente a nivel de la Pro⁴⁵ (Zotzel *et al.*, 2003a); y

una aminopeptidasa (tripeptidil aminopeptidasa de *Streptomyces mobaraensis* o SM-TAP, por su acrónimo en inglés), que elimina un tetrapéptido N-terminal adicional (Phe-Arg-Ala-Pro) presente en la *MTGasa* activada por la metaloproteasa pero no en la enzima madura (Zotzel *et al.*, 2003b). En este punto cabe señalar, sin embargo, que también puede ser activada gracias a la actividad de distintas endoproteasas exógenas, como pueden ser la tripsina bovina o la dispasa de *Bacillus polymyxa* (Pasternack *et al.*, 1998).

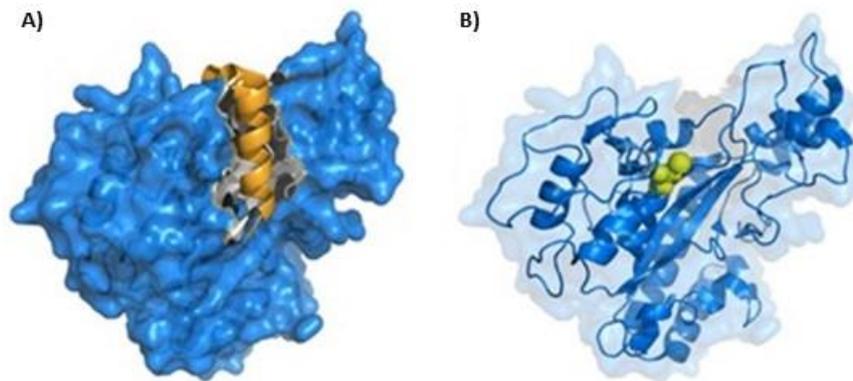


Figura 1.4. A) Estructura terciaria de la *MTGasa* mostrando en color amarillo-oro el centro activo del zimógeno bloqueado por una pro-secuencia con estructura en α -hélice; B) eliminación de dicha pro-secuencia dejando al descubierto el centro activo (Rachel y Pelletier, 2013)

La producción de la *MTGasa* de *Streptomyces mobaraensis* en una forma inactiva es la razón detrás del relativamente poco éxito obtenido con cepas modificadas genéticamente para la producción de transglutaminasa microbiana recombinante, en comparación con las cepas salvajes (Zhang *et al.*, 2013); solo cuando se utiliza *Streptomyces* como microorganismo portador para la clonación se obtienen valores próximos a los de la cepa salvaje (Lin *et al.*, 2008).

1.3.2 Factores reguladores de la actividad de la *MTGasa*

La *MTGasa* es una enzima robusta que, a diferencia de otras *TGasas* de mamíferos, mantiene su actividad sobre un rango considerable de valores de pH y temperatura, y que presenta igualmente factores tanto estimuladores como inhibidores de su actividad, que se describen a continuación.

1.3.2.1 Efecto del pH y la temperatura

El valor óptimo para la actividad de la *MTGasa* de *Streptomyces mobaraensis* se encuentra entre pH de 6.0 a 7.0 (Figura 1.5). Aunque a valores de pH por debajo de 4.5 la actividad de la enzima disminuye bruscamente llegando a ser prácticamente nula a pH 3.5, a 4.0 aún expresa más de un 40% de su actividad enzimática (Ando *et al.*, 1989; Pagani, 2015).

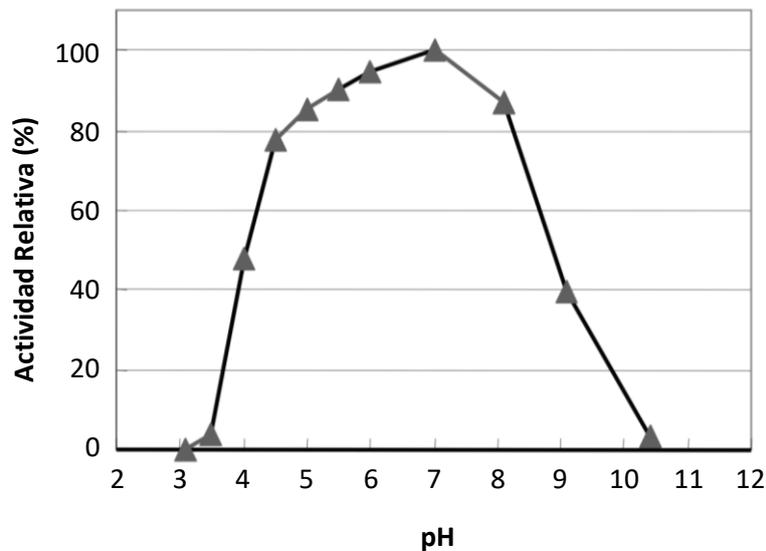


Figura 1.5. Actividad relativa de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* o transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) en función del pH (Pagani, 2015)

Por otro lado, a pH 9.0 también se mantienen valores de actividad enzimática similares (Pagani, 2015). Su punto isoeléctrico es elevado ($pI=8.9$) teniendo en cuenta que para la mayoría de proteínas se encuentra en el rango de 4.0 a 7.0 (Novák y Havlíček, 2016). Además, se sitúa lejos del pH de la mayoría de los alimentos, lo que puede tener un impacto positivo sobre la interacción enzima-sustrato. Las proteínas precipitan alrededor de dicho valor.

La caracterización de la *TGasa* producida por *Streptoverticillium ladakanum* muestra que sus requerimientos para una óptima producción de la enzima son ligeramente diferentes a los de *S. mobaraensis*. Así, se ha observado que la máxima actividad para aquel se da a pH entre 5.0 y 6.0, y que la enzima es estable en el rango de pH de 5.0 a 7.0 (Ho *et al.*, 2000).

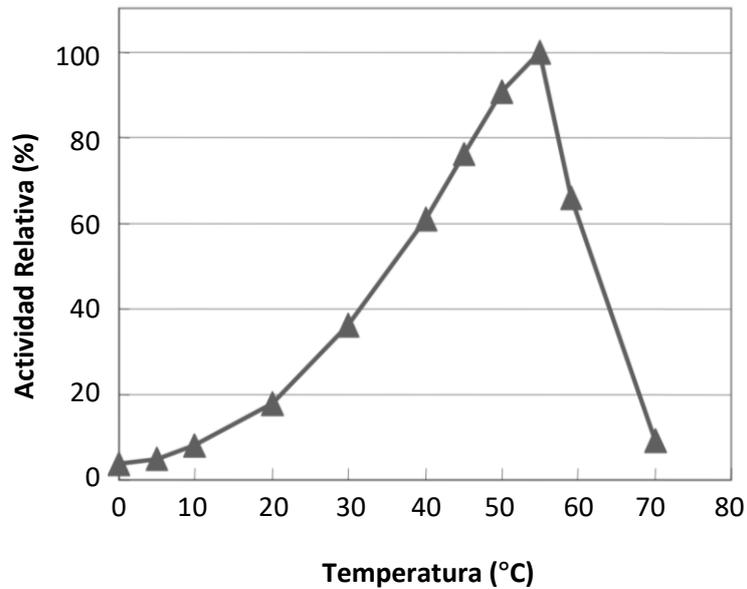


Figura 1.6. Actividad relativa de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* o transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) en función de la temperatura (Pagani, 2015)

En la Figura 1.6 se muestra la actividad relativa de la *MTGasa* comercializada por Ajinomoto® en función de la temperatura (Pagani, 2015). Tal y como puede observarse, el rango de temperatura óptimo es entre 50 y 60 °C. Se ha establecido que para *Streptomyces mobaraensis* la máxima actividad se exhibe a una temperatura aproximada de 50 °C a pH 6.0 (Ando *et al.*, 1989). Sin embargo, de acuerdo con varias fuentes consultadas, la temperatura óptima de la enzima depende de la bacteria que la produzca. Los valores reportados varían desde 37 °C para algunas especies de *Streptomyces* hasta 60 °C para *Bacillus subtilis* (Suzuki *et al.*, 2000; Mabel, 2012). *Streptoverticillium ladakanum* muestra su máxima actividad catalítica a 40 °C (Ho *et al.*, 2000). Además, es importante señalar que la *MTGasa* presenta actividad incluso a temperaturas próximas a 0 °C (Kieliszek y Misiewicz, 2014; Yokoyama *et al.*, 2004).

Por otro lado, dicha enzima se muestra completamente inactiva tras someterla a un tratamiento térmico a una temperatura ≥ 70 °C durante varios minutos (Yokoyama *et al.*, 2004; Jaros *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2009). En la Figura 1.7 se puede observar su actividad residual después de un período de 10 min de aplicación de las distintas temperaturas y a pH 7.0. Debe señalarse que el tiempo requerido para su inactivación en un producto alimentario depende del calibre. Así se ha visto que, en salchichas de un calibre de 3 cm de diámetro, se requieren más de 2 h para la

inactivación de la *MTGasa* cuando el tratamiento térmico es a 65 °C, de 15 min a 70 °C, 5 min a 75 °C, y 1 min a 80 °C (Pagani, 2015).

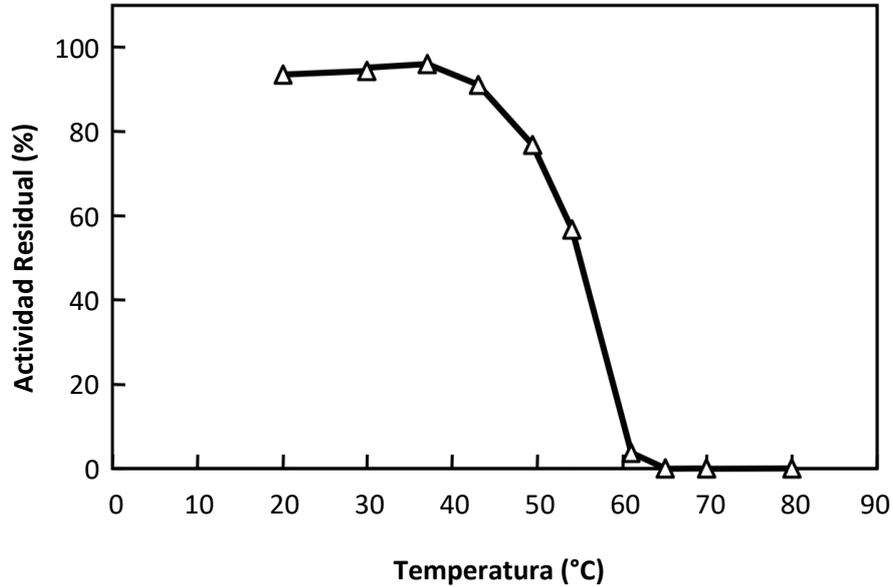


Figura 1.7. Actividad residual de la transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* o transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) en función de la temperatura tras un período de tratamiento de 10 min y a pH 7.0 (Pagani, 2015)

1.3.2.2 Estimuladores de la actividad

La actividad de la *MTGasa* es sensible a la presencia de iones. Así, algunos estudios demuestran que la adición de iones monovalentes (NaCl y KCl) incrementan la actividad enzimática y la estabilidad térmica de la *MTGasa* (Kütemeyer *et al.*, 2005). Por el contrario, se ha observado que en presencia de iones bivalentes solo en algunos casos (Co^{2+} , Ba^{2+} , K^+) aumenta de manera considerable (Alves Macedo *et al.*, 2010; Kieliszek y Misiewicz, 2014); mientras que en otros solo tiene una leve influencia (Mg^{2+}) o incluso disminuye (Ca^{2+}) (Kütemeyer *et al.*, 2005).

1.3.2.3 Inhibidores de la actividad

La actividad de la *MTGasa* es inhibida por compuestos capaces de reaccionar con el grupo -SH de la Cys del centro activo. Así, se ha observado que está fuertemente inhibida en presencia de

Zn²⁺, mientras que otros iones metálicos (Pb²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺) ejercen solo un pequeño efecto inhibidor (Ando *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 2000). Algunos agentes oxidantes actúan también como inhibidores de la enzima al ser capaces de reaccionar con el grupo -SH, entre los que destacan el ácido paracloromercuribenzoico, el N-etilmaleimida y el monoyodo acetato (Ando *et al.*, 1989; Jozami Barreiro y Seselovsky, 2003; Alves Macedo *et al.*, 2010; Kieliszek y Misiewicz, 2014).

De acuerdo con Ho *et al.* (2000), diferencias en la capacidad de ser inhibidas por los distintos inhibidores, pueden sugerir distintos grados de implicación del grupo -SH catalítico en la reacción entre enzimas sintetizadas por distintos microorganismos.

Además, se ha descrito la presencia de sustancias inhibitorias de esta enzima en algunas matrices alimentarias. En este sentido, De Jong *et al.* (2003) observaron que la leche cruda contiene un inhibidor natural de la *MTGasa*, con un peso molecular de 200-250 Da. Esto puede condicionar la dosis de enzima que debe añadirse para obtener los resultados esperados, aunque el tratamiento térmico aplicado para la pasteurización de la leche suele ser suficiente para anular su capacidad de actuar como agente inhibidor. En este sentido, se ha demostrado que temperaturas ligeramente superiores a 75 °C son suficientes para su inactivación (Pagani, 2015).

1.3.2.4 Características del sustrato

Para que una molécula pueda ser un buen sustrato para la *MTGasa* no solo debe contener alguno de los aminoácidos que participan en la reacción, sino que la enzima debe poder acceder fácilmente a ellos (Coussons *et al.*, 1992). Es por ello que las proteínas globulares en su estado nativo tienden a ser pobres sustratos de dicha enzima, aunque esto puede revertirse a través de su desnaturalización total o parcial. Para ello, se puede recurrir a alguna de las siguientes estrategias:

- modificación de factores externos, como puede ser un aumento de la temperatura y un cambio de pH (Lo y Bastian, 1998; Anema y Li, 2003a; Anema y Li, 2003b);
- ruptura de puentes disulfuro gracias a la adición de agentes reductores (ácido ascórbico, glutatión, cisteína) (Coussons *et al.*, 1992; Buchert *et al.*, 2010) o al tratamiento con la enzima disulfuro isomerasa (Hatahet y Ruddock, 2009);

- tratamiento a altas presiones hidrostáticas de las proteínas solas (Huppertz *et al.*, 2004) o en combinación con la enzima debido a que la *MTGasa* es baroresistente (Lauber *et al.*, 2001; Lee y Park, 2002).

Además, se ha observado también que el entorno cercano a los residuos de Gln juega un papel importante en la determinación de su reactividad. En la Tabla 1.3 se muestra el grado de reactividad de distintas proteínas alimentarias frente a la *MTGasa*.

Tabla 1.3. Reactividad de algunas proteínas alimentarias frente a la *MTGasa* (Sakamoto *et al.*, 1994; Jozami y Seselovsky, 2003)

Sustrato	Reactividad
Actina (carne)	Difícilmente reactiva
Mioglobina (carne), β -lactoglobulina y α -lactalbúmina (leche), ovoalbúmina (clara de huevo)	Reactivas bajo ciertas condiciones
Colágeno (carne), gliadinas y gluteninas (trigo), proteínas de la yema de huevo	Reactivas
Gelatina (carne), globulinas 7 S y 11 S (soja), caseinato de sodio y caseína (leche), miosina (carne)	Muy reactivas

Por otro lado, Ohtsuka *et al.* (2000) demostraron que se necesitan al menos 4 átomos de C sin cadenas laterales entre los grupos funcionales, para que una amina primaria pueda ser un buen sustrato para la *MTGasa*.

1.4 La *MTGasa* en la industria alimentaria: beneficios

El interés en utilizar la *MTGasa* en la industria alimentaria resulta no solo de las distintas reacciones que puede llevar a cabo (apartado 1.2), sino también de sus características específicas en relación con *TGasas* obtenidas a partir de otras fuentes. De las tres principales actividades catalíticas descritas, la reacción de entrecruzamiento o polimerización es la que tiene mayor potencial de aplicación en este sector. Estas reacciones, que pueden darse tanto a nivel intramolecular como intermolecular, pueden conllevar cambios muy importantes en el

comportamiento de las macromoléculas proteicas en la matriz alimentaria, especialmente en el caso de la formación de polímeros de elevado peso molecular. En este caso, propiedades como la capacidad de formar geles, de retener de agua, de actuar como agentes emulsionantes y de aportar viscosidad pueden verse fuertemente alteradas y, de esta manera, afectar tanto la estabilidad durante el almacenamiento, como la calidad sensorial del producto final (Heck *et al.*, 2013). Los atributos sensoriales relacionados con la textura son los mayormente afectados, aunque también pueden ser evidentes los efectos a nivel de apariencia y *flavor*. En este sentido, es una realidad que las industrias alimentarias están muy interesadas en explotar este potencial como una estrategia para mejorar su competitividad en el mercado. Al mismo tiempo, la reacción de polimerización puede aportar beneficios a nivel nutricional ya que, por un lado, se protege la Lys de su participación en reacciones de Maillard y, por otro, aunque estas uniones exhiben una gran resistencia proteolítica (Griffin *et al.*, 2002), nuestro cuerpo dispone de enzimas capaces de actuar sobre el enlace Gln-Lys, liberando la Lys involucrada en dicho enlace. La fortificación de alimentos a través de la incorporación de Lys libre a una proteína también puede conseguirse gracias a la reacción de transferencia de grupos acilos. En ambos casos, esto también podría tener efectos, aunque de manera indirecta, sobre los niveles de hormona del crecimiento ya que algunos investigadores mantienen que la Lys en combinación con la Arg promueve su secreción (Isidori *et al.*, 1981), aunque otros estudios no refuerzan esta hipótesis (Corpas *et al.*, 1993). La formación de polímeros a partir de moléculas individuales de proteína puede ser efectiva en algunos casos para disminuir su alergenicidad y para incrementar el efecto saciante de los alimentos.

En relación con la reacción de desamidación, debe tenerse en cuenta que la transformación de Gln en Glu aumenta la carga de la proteína de manera que su solubilidad puede verse alterada y, consecuentemente, su tecno-funcionalidad. Propiedades como la capacidad de formar geles y de formar y estabilizar emulsiones y espumas dependen fuertemente del perfil de solubilidad. Además, la desamidación de las proteínas suele conllevar una disminución del punto isoeléctrico incrementando, de esta manera, su solubilidad en la mayoría de sistemas alimentarios con pH ligeramente ácido.

Aunque las tres reacciones producen amoníaco -el cual puede participar en reacciones de Maillard- los estudios realizados hasta el momento indican que la actividad de la *MTGasa* no

está relacionada con la aparición de sabores desagradables, ni con la formación de productos tóxicos.

Si bien las reacciones que puede llevar a cabo la *MTGasa* no difieren de las actividades catalíticas de otras *TGasas*, algunas características específicas de la enzima además de su actividad no dependiente de Ca^{2+} la hacen mejor candidata para su aplicación a nivel industrial. Entre ellas, cabe destacar (Kashiwagi *et al.*, 2002; Yokoyama *et al.*, 2004):

- la reacción de entrecruzamiento procede a mayor velocidad que las otras dos actividades catalíticas;
- una menor actividad de desaminación;
- no requiere de cofactores ni moduladores (GTP);
- un menor peso molecular (~38 kDa, alrededor de la mitad del de la mayoría de *TGasas* de mamíferos), lo que facilita su acceso a los residuos aminoacídicos de interés, aspecto especialmente interesante a medida que procede la reacción de polimerización;
- una menor especificidad por el sustrato, lo que hace posible aplicarla en matrices alimentarias diferentes;
- una mayor estabilidad térmica;
- mayor *pI* (8.9 *versus* 4.5, respectivamente).

A todas esas ventajas, deben sumarse aquellas relacionadas con su mayor facilidad de producción y purificación, su fácil aplicación y el hecho de que ha sido aceptada como GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) desde 1998 para la polimerización proteica en productos del mar, cárnicos, lácticos y cereales (FDA/CFSAN: GRAS 000004,1998; 000029, 1999; 000055, 2001; y 000095, 2002). Hasta la fecha y a la espera de la lista positiva que debe aprobar la UE, en esta región se considera un coadyuvante tecnológico, lo que también resulta interesante para las empresas del sector alimentario.

1.4.1 Aplicaciones en la industria alimentaria

La capacidad única de la *MTGasa* de formar entrecruzamientos covalentes entre proteínas y los importantes efectos que esto produce en sus propiedades físicas y químicas, ha generado un

enorme interés y ha elevado el uso de este biocatalizador en un amplio rango de sectores de la industria, especialmente en el de los alimentos, aunque no exclusivamente. De esta manera, se ha dado un gran impulso al desarrollo de tecnologías y formulaciones innovadoras a base de *MTGasa* para modificar y manipular la funcionalidad de ingredientes proteicos en la elaboración de diferentes productos alimentarios (Palafox Carlos y García Carreño, 2007).

El empleo de la *MTGasa* en la industria alimentaria resultó, inicialmente, de su capacidad para obtener productos reestructurados a partir de retales de tejido muscular o de piezas de bajo valor comercial (Zhu y Tramper, 2008). Concretamente, su uso comenzó con la elaboración de productos de *surimi* (pasta de pescado) en Japón para mejorar sus propiedades físicas (textura, elasticidad y firmeza) y su capacidad de retención de agua, y posteriormente en productos reestructurados, consiguiéndose alargar de manera importante la vida útil de estos gracias a la ralentización del crecimiento de bacterias coliformes y psicrófilas, y al retraso en la formación de bases volátiles totales y trimetilamina (Yerlikaya *et al.*, 2017). Además, la aplicación de *MTGasa* en pescados y mariscos crudos permite su congelación sin cambios en la textura, mediante el remojo de los productos en una solución de enzima y caseinato, dándoles una textura firme y masticable (Kuraishi *et al.*, 2001). El uso de *MTGasa* para la obtención de productos reestructurados se extendió rápidamente al sector cárnico, debido a que de esta manera no era necesario agregar altas cantidades de sales de cloruro de sodio o fosfatos, sin efectos sobre su color. En ambos sectores, de productos de la pesca y cárnico, la *MTGasa* también se está aplicando para la obtención de productos de imitación, como por ejemplo aleta de tiburón (Tramper y Poulsen, 2000) y panceta (BDF Natural Ingredients SL, 2018). La sopa de aleta de tiburón es un plato muy apreciado en China. Sin embargo, la demanda de aleta está experimentando una disminución considerable por distintas razones, las cuales incluyen su elevado precio, los efectos negativos de su consumo a nivel ecológico, motivos éticos debido a la crueldad que conlleva la práctica del aleteo, y cuestiones relacionadas con la seguridad alimentaria, ligadas a la elevada presencia de mercurio en escualos. De ahí el interés en elaborar un producto de imitación con características sensoriales similares, pero sin las implicaciones negativas asociadas al producto original. Normalmente, se elabora con colágeno, gelatina o una mezcla de ambos. En estos dos sectores de la industria alimentaria, la *MTGasa* se está usando además para la elaboración de productos tanto bajos en sal como con un contenido reducido de fosfatos (Téllez-Luis *et al.*, 2002; Daray *et al.*, 2014). En el caso de emulsiones cárnicas, jamón

cocido y productos fermentados se aplica también con la intención de mejorar no solo la textura sino también las pérdidas durante el loncheado.

En el caso de la industria panadera, la *MTGasa* se ha utilizado para incrementar la fuerza de la masa y el volumen del pan (Guastaferrero Seravalli *et al.*, 2011); este aumento de la fuerza debido a la actividad de la enzima se asocia también a una mayor resistencia durante su congelación (Kim *et al.*, 2008). También permite fortalecer harinas débiles o de baja calidad (Köksel *et al.*, 2001) y elaborar panes con formulaciones más allá de las consideradas dentro del concepto normativo de pan (Pourmohammadi *et al.*, 2017); por ejemplo, se aplica con la intención de mejorar las características de los productos elaborados sin gluten, con diferente resultado en función del tipo de proteína utilizado (Smerdel *et al.*, 2012; Dłużewska *et al.*, 2015).

La *MTGasa* también se ha aplicado con éxito en la elaboración de productos derivados de la soja. Así, se ha utilizado para mejorar la textura del tofu (Bin Md Yasir *et al.*, 2007), para obtener un queso crema a partir de proteína de soja (Lim *et al.*, 2011) y para mejorar las propiedades funcionales de proteínas procedentes de otras leguminosas, además de la soja (Ali *et al.*, 2011).

Los efectos de la *MTGasa* en las proteínas de la leche y productos lácteos también han sido ampliamente estudiados, con aplicaciones muy diversas de dicha enzima en este sector de la industria alimentaria; eso es debido a la elevada reactividad de las caseínas frente a la *MTGasa*, aunque las proteínas globulares del suero reaccionan únicamente bajo condiciones que favorezcan el despliegue (Gauche *et al.*, 2008). En yogures, el tratamiento de la leche con *MTGasa* incrementa su firmeza, viscosidad y reduce la sinéresis (Jooyandeh *et al.*, 2015); mientras que en quesos de distintos tipos incrementa el rendimiento de la cuajada, mejora su composición química, así como su textura y/o disminuye la sinéresis (Mahmood y Sebo, 2009; Di Pierro *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013; Karzan *et al.*, 2016). En la elaboración de helados, la aplicación de la enzima permite la producción de helados bajos en grasa (Rossa *et al.*, 2012; Gharibzahedi *et al.*, 2018).

Otras aplicaciones de la *MTGasa* en la industria alimentaria incluyen la texturización de proteínas de fuentes distintas (proteínas séricas, caseínas, proteínas de soja y de trigo, entre otras); la encapsulación de lípidos y/o materiales solubles en lípidos (Bao *et al.*, 2011); la formación de películas o films resistentes al agua y al calor, en ocasiones aplicados con éxito en

productos de IV gama (Rossi Márquez *et al.*, 2017); la gelificación en frío (Moreno *et al.*, 2010); la modificación de la solubilidad y otras propiedades funcionales como, por ejemplo, la mejora de la firmeza, la elasticidad y la capacidad de retención de agua de proteínas para su uso en la elaboración de alimentos como ingredientes tecno-funcionales (Erwanto *et al.*, 2003; Saguer *et al.*, 2007), incluyendo dulces para niños con bajas calorías y buenas propiedades texturales elaborados con gelatina o para la aplicación de ésta en usos culinarios (Calvarro *et al.*, 2016); para minimizar la alergenicidad de algunas proteínas, como en el caso de las caseínas (Lauber *et al.*, 2000; Ozer *et al.*, 2007); y para la producción de alimentos proteicos de alto valor nutricional, por la unión de diferentes proteínas que contengan aminoácidos esenciales complementarios (Matheis y Whitaker, 1987; Zhu *et al.*, 1995; Motoki y Seguro, 1998).

Para que la *MTGasa* funcione en un alimento, este debe contener una proteína que permita la reacción con la enzima, así como las condiciones que faciliten su actividad. Esto se encuentra determinado en gran parte por la disponibilidad de glutamina y lisina dentro de la proteína. Por esta razón, en la industria alimentaria se elaboran formulaciones de la *MTGasa* con otros ingredientes, que contienen la proporción adecuada de enzima y proteína-sustrato u otro soporte, que varían de acuerdo con la aplicación y el método de adición al producto. Entre las preparaciones más comunes se encuentran aquellas destinadas a la modificación de la textura de un producto, donde la enzima se estandariza con una matriz neutra que consiste generalmente en maltodextrina junto con proteínas como caseinato, gelatina y proteínas de soja, para favorecer la creación de enlaces covalentes proteicos (Payne, 2009).

1.4.1.1 Elaboración de quesos frescos

En el caso de queso fresco, el rendimiento es un parámetro fundamental para los productores, ya que diferencias mínimas en su valor implican grandes efectos en los beneficios económicos. En este sentido, la incapacidad de las proteínas nativas del suero de la leche para ser retenidas en la cuajada, ha sido reconocido como uno de los factores más determinantes en la baja eficiencia del proceso de conversión de la leche en queso y, al mismo tiempo, parcialmente responsable del impacto ambiental asociado a las industrias queseras; su presencia en los efluentes líquidos vertidos, junto con otros compuestos como la lactosa, les convierte en una fuente importante de materia orgánica contaminante en el medio ambiente (Sienkiewicz y

Riedel, 1990; Gonzáles Siso, 1996). Por lo tanto, debe tenerse en cuenta que a partir de la producción de 1 kg de queso se generan 9 kg de suero (Kosikowski, 1979), y que la producción anual de suero de leche continúa creciendo progresivamente debido al mayor consumo de queso a nivel mundial (Gonzáles Siso, 1996). A pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas para la reutilización de este subproducto de la industria quesera, aproximadamente solo la mitad de la producción mundial se emplea en la elaboración de varios productos alimentarios, tanto de forma líquida como en polvo, en forma de lactosa, así como subproductos secundarios y concentrados de proteína (Marwaha y Kennedy, 1988); la otra mitad no es tratada, sino que se descarta como efluente (Motta-Correa *et al.*, 2015). Es por ello que se hace necesaria la aplicación de nuevas estrategias para un mejor aprovechamiento del suero, que contribuyan a reducir la contaminación causada por el vertido de este subproducto como material de desecho en el medio ambiente (Cozzolino *et al.*, 2003). Hasta el momento, distintos tratamientos y tecnologías han sido ensayados y desarrollados buscando incorporar las proteínas del suero en la matriz del queso; estos incluyen desde el tratamiento térmico de la leche, el uso de membranas de separación y la adición directa de leche o de derivados del suero, hasta tecnologías más modernas y avanzadas como la alta presión hidrostática, la homogeneización a ultra-alta presión y la adición directa de mazada (Masotti *et al.*, 2017). El tratamiento con *MTGasa* también está considerado como una estrategia económica viable para incrementar la recuperación del suero durante la elaboración del queso, principalmente - aunque no de manera exclusiva- cuando el cuajo es empleado como agente coagulante (Cozzolino *et al.*, 2003; Mazuknaite *et al.*, 2013; Domagala *et al.*, 2016). En este contexto es importante señalar que, a lo largo de las últimas décadas, se han llevado a cabo trabajos centrados en el estudio de los efectos que conlleva su adición durante el proceso de elaboración de queso, aunque con distintos enfoques en cuanto a condiciones de proceso y parámetros evaluados: incubación previa de la leche con/sin inactivación posterior de la enzima (Lauber *et al.*, 2000; Lorenzen, 2000a; Jaros *et al.*, 2010); adición conjunta de la enzima con el cultivo iniciador (Faergemand *et al.*, 1999; Neve *et al.*, 2001; Jaros *et al.*, 2006); adición de dosis variables de la enzima (Farnsworth *et al.*, 2006); así como la aplicación previa, conjunta o posterior de la *MTGasa* a la adición del agente coagulante (Han y Spradlin, 2000; Lorenzen, 2000a; Lorenzen, 2000b; Cozzolino *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003).

A pesar de las diferencias en los productos evaluados y en los experimentos llevados a cabo, la mayor parte de los estudios coinciden en que la aplicación de la *MTGasa* contribuye a la

modificación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de los productos lácteos, a través de la formación de enlaces covalentes entre proteínas lácteas, generando asimismo cambios en la estructura y en otras propiedades relacionadas.

Incrementos mínimos en el contenido de agua del producto, así como la unión de conglomerados proteicos, pueden ejercer una influencia favorable en el rendimiento del queso y la efectividad económica. Se sabe que, además del incremento en el rendimiento por la mejora en la recuperación del suero, los enlaces covalentes adicionales relacionados con la actividad de la *MTGasa* mejoran la estructura de la cuajada debido a sus efectos sobre la red de proteínas que la constituyen (Anema *et al.*, 2005), implicando de esta forma cambios tanto en las propiedades fisicoquímicas como funcionales del queso (Mazuknaite *et al.*, 2013). También se ha demostrado que el grado de entrecruzamiento alcanzado puede verse afectado por la presencia de grasa, que puede interferir con la actividad de la *MTGasa*, razón por la cual, en la mayoría de las aplicaciones de la enzima en la elaboración de productos lácteos, se emplea leche baja en grasa (Kaláb *et al.*, 1983; Ozer *et al.*, 2007; Sayadi *et al.*, 2012 y 2013; Darnay *et al.*, 2016; Danesh *et al.*, 2018).

1.4.1.1.1 Quesos de coagulación ácida tipo quark

El quark es un queso fresco elaborado mediante un proceso de coagulación ácida de la leche, a través de la actividad de bacterias ácido-lácticas mesófilas, con una vida útil corta - aproximadamente 3 semanas a una temperatura <8 °C- debido a su relativamente elevado contenido de humedad. Tradicionalmente es elaborado con leche desnatada de alta calidad, si bien también puede fabricarse a partir de leche entera (Farkye y Vedamuthu, 2005). Este tipo de queso tiene su origen en Alemania, donde es producido a gran escala debido a su popularidad, aunque su uso también es común en las cocinas de países de habla germana, como Austria y Suiza, en el norte y centro de Europa, los países eslavos y los pertenecientes a la antigua Unión Soviética. Esta amplia distribución geográfica en relación con su elaboración y/o consumo hace que se refiera a él con distintos nombres (*kvarg*, *tvarog*, *tworog*, *twarog*, *sauermilchquark* y *speisequark*). Tiene características similares al *fromage frais* y al *queso/queijo fresco* de la Península Ibérica, y también se asemeja a quesos de otras regiones de mundo como el *chakka* del sudeste asiático, el *labneh* árabe o el *kashk* de Asia Central, aunque estos se obtienen a partir

de yogur colado (fermentado con bacterias termófilas). Además, puede usarse como ingrediente para agregar atractivo sensorial y valor nutricional a los alimentos. Su sabor y textura suaves lo hacen excelente como cobertura o relleno para una importante variedad de platos.

A pesar de que el quark tradicional es elaborado sin adición de cuajo, en las industrias lácteas modernas la coagulación de la leche es cada vez más inducida por una acción combinada del ácido láctico de los cultivos iniciadores y el efecto de una relativamente baja cantidad de cuajo, buscando mejorar la firmeza de la cuajada y las características de desuerado, de manera que se reduzcan los problemas de sinéresis durante el almacenamiento del queso, y minimizar las pérdidas de caseína en el suero durante el proceso de manufactura del queso (Jelen y Renz-Schauen, 1989; Schulz-Collins y Senge, 2004).

1.4.1.1.2 Quesos de coagulación enzimática

El queso fresco de coagulación enzimática es un tipo de queso blando que retiene gran parte del suero y que no se somete a un proceso de maduración, por lo que se encuentra listo para el consumo poco después de su fabricación. En este caso la coagulación se produce cuando se añade un agente o mezcla de agentes coagulantes de naturaleza enzimática a la leche, con la capacidad de desencadenar la formación de coágulo bajo determinadas condiciones.

En algunos países europeos, así como en América Latina y Oriente Medio, es común el consumo de queso fresco de coagulación enzimática sin adición o con una cantidad mínima de cultivos ácido-lácticos, por lo que la coagulación se produce completamente por acción del cuajo al pH natural de la leche. Este tipo de quesos se consumen frescos y tienen una vida útil de entre 2 y 4 semanas. Algunas de las variedades conocidas son queso fresco italiano, feta, halloumi, telemea, queso blanco, queso fresco, queso panela, queso oaxaca, queso campesino, quesillo, kkawi, chanakh y el queso blanco iraní, entre otros (Litopoulou-Tzanetaki, 2007; Ramírez-López y Vélez-Ruiz, 2012).

Según McSweeney *et al.* (2017), los quesos de coagulación enzimática representan aproximadamente un 75% de la producción total de queso a escala mundial, mientras que alrededor del 25% corresponde a los de coagulación ácida. Por esta razón los coagulantes de la

leche son esenciales en la producción de quesos y constituyen una de las enzimas más importantes de la industria alimentaria.

Tradicionalmente y durante miles de años, se han empleado extractos crudos preparados a partir del abomaso (cuarto estómago) de terneros jóvenes, en los cuales el ingrediente activo principal es un tipo de proteasa aspártica, más conocida como quimosina (EC 3.4.23.4). Además de la quimosina, en el abomaso también se secretan la pepsina (EC 3.4.23.1) y la gastricina (EC 3.4.23.3) (Andrén, 2011). La quimosina y la pepsina juegan un papel doble en la producción de queso, ya que convierten la leche en cuajada en pocos minutos bajo condiciones específicas (actividad coagulante) y contribuyen a la proteólisis que ocurre durante la maduración del queso (actividad proteolítica) (IDF, 1997). La quimosina es conocida por su alta especificidad en el corte del caseinomacropéptido (CMP) de la κ -caseína (κ -CN), mientras que la pepsina es mucho menos específica e hidroliza enlaces con residuos de Phe, Tyr, Leu o Val (Agudelo *et al.*, 2004; Papoff *et al.*, 2004).

La quimosina producida naturalmente presenta tres variantes genéticas, A, B y C, de las cuales la B es la variante dominante (frecuencia alélica del 50%), y la C es la más rara (10%) en los extractos de estómago bovino. Mientras que de la variante C no se tiene información acerca de la secuencia primaria de aminoácidos, se sabe que las variantes A y B solo difieren en un aminoácido, ubicado en la posición 244. La quimosina A presenta un ácido aspártico en esta posición, lo que le confiere un 50% más de especificidad en la actividad de coagulación de la leche sobre la quimosina B, que posee una glicina. A pesar de dicha diferencia, se considera que ambas variantes poseen las mismas propiedades para la producción de queso (Andrén, 2011).

Asimismo, la quimosina está considerada como el mejor agente coagulante debido a su alta especificidad para romper el enlace Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ de la κ -CN (Vasbinder *et al.*, 2003; Ahmed *et al.*, 2016) liberando el CMP, lo que desencadena la desestabilización de las micelas de caseína y, por lo tanto, induce la coagulación de la leche (Hyslop, 2003; Crabbe, 2004). En esta, la estabilidad de las micelas de caseína se debe a la presencia de una capa vellosa de moléculas de κ -CN que sobresalen de la superficie de las micelas, generando una repulsión estérica que impide la colisión entre dos micelas de caseína (Walstra, 1990; Holt y Horne, 1996). La conversión de la leche en cuajada/queso, se lleva a cabo en dos etapas que se solapan (Figura 1.8). En la primera etapa, conocida como fase enzimática, la parte hidrofílica de la κ -CN que

sobresale de la superficie micelar (fragmento que incluye los residuos 106-169) o CMP, es cortado por acción de la quimosina y difunde hacia la fracción sérica. La segunda etapa o fase no-enzimática comienza cuando una cantidad suficiente de κ -CN es hidrolizada (para- κ -CN), disminuyendo las fuerzas de repulsión y aumentando la hidrofobicidad de las micelas por la presencia de para- κ -CN en la superficie de las micelas. Las micelas bajo efecto de la quimosina parecen ser incapaces de agregarse hasta que no se haya destruido entre el 60% - 80% de su κ -CN, después de lo cual la concentración de micelas capaz de agregarse aumenta rápidamente. Esto resulta en una mayor agregación de caseínas y finalmente en la formación de una red tridimensional conformada por cadenas de micelas flocluladas (Belitz *et al.*, 2001; Yuksel, 2013).

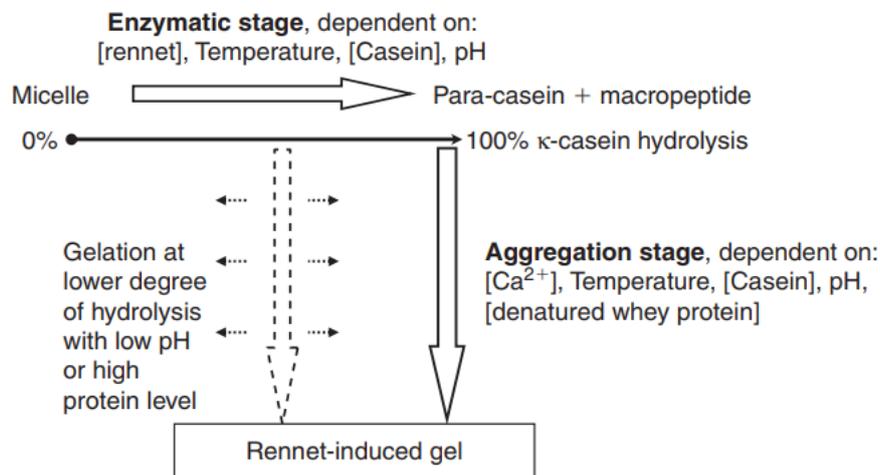


Figura 1.8. Etapas en el proceso de coagulación enzimática de la leche para la elaboración de queso (Lucey, 2009)

El suministro cada vez más limitado de cuajo animal natural, junto con el incremento en la producción de queso, así como factores éticos y religiosos, han hecho cada vez más frecuente el uso de alternativas para la coagulación de la leche en la producción de queso, como los coagulantes extraídos de plantas, los microbianos o la quimosina producida mediante ingeniería genética (Bennett y Johnston, 2004; Chazarra *et al.*, 2007).

El uso de proteasas de origen vegetal como coagulantes alternativos resulta interesante debido a su carácter natural y a la posibilidad de ser empleadas en la producción de quesos para los mercados ecológicos y lacto-vegetarianos. Estas proteasas son obtenidas generalmente por maceración de los órganos superiores de plantas, de las cuales se obtienen enzimas como la papaína de la papaya, la bromelina de la piña o extractos del árbol de la higuera, que han sido

ampliamente investigados como posibles coagulantes de la leche. A pesar de esto, su actividad coagulante no es lo suficientemente elevada para la fabricación comercial de queso (Jacob *et al.*, 2011). Sin embargo, los extractos de cardo (*Cynara cardunculus* L.), que han sido empleados durante siglos en la producción artesanal de queso, contienen dos enzimas: la cardosina A -que, de forma similar a la quimosina por lo que a parámetros de cinética enzimática se refiere, escinde la κ -CN bovina únicamente entre los aminoácidos Phe¹⁰⁵ y Met¹⁰⁶- y la cardosina B, que es comparable a la pepsina en términos de especificidad y actividad, y más proteolítica que la cardosina A (Macedo *et al.*, 1993; Esteves *et al.*, 2002). Sin embargo, se considera que ambas cardosinas presentan una alta actividad proteolítica -mayor que la de la quimosina- y coagulante de la leche (Veríssimo *et al.*, 1996; Esteves *et al.*, 2002; Prados *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que cardosinas y quimosina actúan de manera muy similar sobre la κ -CN, se han atribuido los cambios observados tanto en las características de proceso como en la calidad del queso entre ambos tipos de cuajo, a la mayor actividad proteolítica de las cardosinas sobre las α_{s1} - y β -CNS en relación con la quimosina (Macedo *et al.*, 1996). Estos cambios incluyen una reducción del rendimiento del queso, una disminución de su firmeza y un aumento de la percepción de sabores amargos (Esteves *et al.*, 2002; Lo Piero *et al.*, 2002). Sin embargo, Fernández-Salguero *et al.* (2002) comentan que la fuerte acción proteolítica produce quesos con una textura suave y mantecosa, de aroma particular y con un sabor ligeramente picante y cremoso, muy apreciados por su sabor y calidad. En un estudio posterior, Prados *et al.* (2007) reportan en el mismo sentido, que la alta actividad proteolítica de las cardosinas podría utilizarse para acelerar el proceso de maduración en queso Manchego y tipo "Manchego", y el desarrollo de las cualidades fisicoquímicas, bioquímicas y sensoriales típicas, en un período de tiempo más corto.

Los coagulantes microbianos han sido una alternativa a los cuajos de origen animal debido a que pueden ser fácilmente producidos mediante fermentación, presentando una disponibilidad casi ilimitada a un coste económico mucho menor, sin riesgo de contagio de enfermedades transmitidas por rumiantes y su consumo es aceptado por los lacto-vegetarianos. Los más frecuentemente usados y que presentan mayor importancia han sido los de origen fúngico, debido a que los hongos productores de proteasas son ubicuos y pueden aislarse fácilmente de diversos ambientes (Tubeshya y Al-Delaimy, 2003). Entre estos, se han identificado principalmente tres especies para la producción a gran escala: *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *Cryphonectria parasitica* de los cuales el primero es el más ampliamente usado en la industria productora de quesos y se encuentra comercialmente disponible en diferentes niveles

de termoestabilidad y pureza. Como la quimosina, todos sus sustitutos comerciales reconocidos son proteasas aspárticas ácidas, y las propiedades moleculares y catalíticas son generalmente similares. La proteasa del *Rhizomucor miehei* presenta una gran similitud con la estructura tridimensional de la quimosina, así como con las cantidades de Phe, Thr y Lys, no contiene grupos tiol activos y presenta una pérdida de actividad proteolítica del 50% después de 30 min a 45 °C (Sternberg, 1971; Preetha y Boopathy, 1997; Chitpinyol y Crabbe, 1998). La mayoría de los coagulantes microbianos, incluyendo el derivado de *Rhizomucor miehei*, hidrolizan el mismo enlace Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ que la quimosina, mientras que el de *Cryphonectria parasítica* hidroliza el enlace Ser¹⁰⁴-Phe¹⁰⁵ (Drøhse y Foltmann, 1989). Sin embargo, a diferencia de la quimosina, tanto la proteasa de *Rhizomucor miehei* como la de *Cryphonectria parasítica* también escinden otros enlaces en la κ-CN (Fox *et al.*, 2017a).

En cuanto a los desarrollos en ingeniería genética como alternativa para la coagulación de la leche, la versión recombinante de la quimosina de ternera -conocida como quimosina producida por fermentación (FPC, por sus siglas en inglés)- fue la primera ayuda para el procesado de alimentos desarrollada con la tecnología del ADN recombinante, registrada por la FDA (Flamm, 1991). Después de clonar el ADN de un precursor de la quimosina de células del abomaso de *Bos taurus*, este pudo ser transferido como vector a microorganismos GRAS, entre los que se encuentran *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* o *Trichoderma reesii* (Teuber, 1990; Mohanty *et al.*, 1999). En principio, debido a que la FPC presenta la misma secuencia de aminoácidos que la quimosina natural, sus propiedades deberían ser las mismas. A pesar de esto, es posible que el microorganismo productor pueda añadir algunos residuos a la molécula de quimosina, como ocurre en la glicosilación fúngica. Sin embargo, no se han observado cambios significativos en las propiedades de la FPC en comparación con las de la de origen animal, evidenciado por su gran éxito en el mercado, con aproximadamente el 50% de la cuota de mercado en el mundo en 2016 (Andrén, 2016). Entre las desventajas de la FPC está la falta de pepsina que sí se encuentra en los cuajos de origen animal, pero que puede resolverse fácilmente con la adición de pepsina bovina. Además, se ha encontrado la reticencia de consumidores que pueden considerar el queso producido con FPC como modificado genéticamente, aunque es importante tener en cuenta que la dosis que se adiciona a la leche es mínima y solo aproximadamente una quinta parte de esa cantidad permanece en el queso (Andrén, 2011).

El agente de coagulación utilizado en la producción del queso puede tener un efecto importante en la degradación de la matriz proteica y afectar la calidad del queso en general, a través de su actividad proteolítica sobre las κ -, α_{s1} - y β -CNS, lo que puede generar cambios significativos en el rendimiento, la textura y el desarrollo de sabores (Macedo *et al.*, 1996). Los efectos en el rendimiento y en la textura son debidos a la formación de péptidos solubles que se pierden en el suero y a la exposición o pérdida de nuevos sitios de interacción proteína-proteína, lo que influye en la sinéresis (Dejmek y Walstra, 2004); mientras que el efecto sobre el sabor se debe esencialmente a la formación de péptidos amargos (Macedo *et al.*, 1996). Por lo tanto, los parámetros técnicamente importantes como el tiempo de coagulación, la firmeza y elasticidad del gel, la fracción de κ -CN hidrolizada o la sinéresis no dependen únicamente de los factores intrínsecos de la leche -como la concentración de caseína, pretratamiento térmico, pH, temperatura, contenido de calcio- sino también de las propiedades específicas del agente coagulante (O'Callaghan *et al.*, 2000; Jaros *et al.*, 2008).

1.4.1.2 Obtención de análogos de queso

Los análogos de queso son definidos generalmente como productos elaborados a partir de la mezcla de componentes individuales, generando un producto similar al queso, que cumpla con unos requisitos específicos (Bachmann, 2001). El hecho de que también sean denominados sustitutos o imitaciones no implica que su calidad sea inferior a la de los quesos tradicionales, sino que los procesos, la tecnología y la materia prima empleados en su producción son diferentes.

Desde finales del siglo pasado, diversos investigadores se interesaron por este tipo de productos, previendo que los análogos de queso supondrían una competencia en crecimiento para los quesos naturales, debido a que surgieron como resultado de la demanda del mercado y gracias a la evolución de la tecnología del producto. Dichos autores reportaban que, con un mayor desarrollo de los quesos análogos -especialmente en cuanto al sabor- junto con menores costos, nuevas consideraciones nutricionales encaminadas a las demandas de los consumidores y un etiquetado más informativo, sería cuestión de poco tiempo para que este tipo de productos se abriera un espacio en el mercado minorista del queso (Shaw, 1984; Bachmann, 2001).

Actualmente, puede darse por válido que los quesos análogos o de imitación constituyen un nuevo nicho de negocio dentro de la industria láctea, como lo demuestran algunos datos del mercado alimentario. La producción anual de quesos análogos en Estados Unidos es de alrededor de 300 000 t, siendo la principal región productora del mundo, con los productos principales como sustitutos o imitaciones de mozzarella de baja humedad, queso Cheddar y queso Cheddar procesado pasteurizado. En contraste, el mercado europeo -con 20 000 t al año- es relativamente pequeño, lo que podría estar relacionado con una destinación inferior del queso como ingrediente en alimentos preparados y formulados. Entre las principales aplicaciones de los análogos de queso están como ingrediente de pizzas congeladas y como lonchas en hamburguesas; además se utilizan en ensaladas, sándwiches, para el gratinado de pastas, salsas y *dips* de queso, y comidas preparadas (Guinee, 2017). Bi *et al.* (2016) reportaron incluso que el incremento en la demanda de queso análogo de mozzarella como ingrediente para pizzas no solo ha generado problemas de abastecimiento, sino que también ha aumentado el costo del producto.

En los análogos de queso, la grasa de leche, la proteína láctea o ambas pueden ser sustituidas parcial o totalmente por componentes no lácteos, principalmente de origen vegetal; razón por la cual pueden ser caracterizados como lácteos, parcialmente lácteos y análogos no lácteos, dependiendo de si los componentes grasos y/o proteicos son de origen lácteo o vegetal (Shaw, 1984). En este tipo de producto, la distribución de la proteína y la grasa, así como el contenido de agua, grasa y el rango de pH determinan en gran medida la textura final, entre otras características (Cavalier *et al.*, 1990; Marshall, 1990; Lobato-Calleros *et al.*, 1997). El mercado de los quesos análogos no lácteos es muy pequeño, pero ofrece oportunidades interesantes para el sector vegano, debido a que tanto la grasa como la proteína son de origen vegetal. Sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que la sustitución de caseína por proteínas vegetales resulta en productos con una textura deteriorada y sabores atípicos (Guinee, 2017). La proteína de soja, por ejemplo, a pesar de que su valor biológico es superior al de la caseína (Ahmed *et al.*, 1995), presenta importantes diferencias con las proteínas lácteas en sus propiedades moleculares y funcionales, como un tamaño superior, una estructura cuaternaria compleja y el hecho de no ser fosfoproteínas como lo son las caseínas (Bachmann 2001). Por lo tanto, la aplicación de proteína de soja en quesos análogos puede dificultar la obtención de una textura propia de queso, que se consigue normalmente empleando caseínas o caseinatos, así como aportar sabores característicos no deseados al producto análogo. Esta característica en

particular es uno de los atributos que más afecta la aceptación de los quesos análogos preparados a partir de proteína de soja (Pereira *et al.*, 1992), por lo cual hasta el momento no parecen tener una importancia comercial significativa (Guinee, 2017). En este sentido, tienen muchísima más importancia los análogos parcialmente lácteos, en los que la grasa es principalmente proveniente de fuentes vegetales y la proteína es de origen lácteo, siendo los más frecuentemente elaborados (Guinee, 2017).

En cuanto a los análogos lácteos, en los cuales se aplican la grasa y proteínas de la leche, principalmente caseína, caseinatos o mezclas similares (Mulsow *et al.*, 2007), suponen una ventaja considerable en relación con el aporte de características físicas y funcionales semejantes a las de los quesos naturales. Además, las propiedades organolépticas de carácter lácteo que proporciona el uso de componentes provenientes de la leche son un aspecto clave para la aprobación del queso análogo por parte del consumidor. En este sentido, se ha reportado que la grasa contribuye con el *flavor* y la textura del queso y, de forma similar, las proteínas lácteas ayudan a dar espesor y forma a la mezcla y participan en el desarrollo de propiedades texturales y reológicas como la firmeza, adhesividad y cohesividad, entre otras (Guinee, 2017). Shah *et al.* (2010) estandarizaron un proceso para la producción de un análogo lácteo de queso mozzarella, con un contenido del 26.2% de proteína y 21.8% de grasa. Para ello consideraron conveniente emplear nata láctea debido a su contenido de grasa en forma emulsionada y a su mayor aporte de sabor. Además, teniendo como referencia el queso mozzarella natural en el cual se emplea cuajo para la coagulación, se optó por trabajar con caseína de cuajo alimentaria, un producto obtenido a través de la separación, lavado y secado del coágulo de la leche desnatada mediante la reacción del cuajo u otras enzimas coagulantes, de forma que el producto final presentara unas propiedades funcionales similares a las del queso de referencia, dando como resultado un queso de buena calidad, con las características requeridas para la aplicación como ingrediente en pizzas.

Los análogos lácteos de queso también representan un vehículo interesante para la inclusión de ingredientes a base de proteínas, lo que ha facilitado la utilización de subproductos y diferentes excedentes de la industria láctea, que con el incremento mundial en el consumo de queso derivaron en un importante problema para el medio ambiente y la salud, debido a su alto contenido de materia orgánica (Yadav *et al.*, 2015). Entre ellos, el suero es uno de los derivados más problemáticos, ya que el obtenido a partir de la fabricación de queso constituye entre el

70-90% del volumen original de leche (Walstra *et al.*, 2006), por lo que en las últimas décadas se ha trabajado intensamente en procurar una gestión adecuada de este y otros subproductos mediante la explotación de sus propiedades tecnológicas, funcionales y nutricionales (Guyomarc'h *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2015) a través de su procesamiento en diversos derivados, favoreciendo la incorporación como ingredientes en diferentes alimentos. La industria láctea ha representado un papel pionero en el desarrollo de técnicas que permitan la retención o la reintegración de proteínas séricas en el producto, incrementando el contenido final de proteína y disminuyendo las pérdidas, con procesos que incluyen el tratamiento térmico de la leche, tecnologías de separación de membrana y adición directa de derivados de leche o suero; así como técnicas más modernas entre las que se encuentran la alta presión hidrostática, la homogeneización a ultra alta presión, el tratamiento de la leche con enzimas como la transglutaminasa y la adición directa de suero de leche (Masotti *et al.*, 2017).

En la actualidad, la ultrafiltración (UF) es el proceso de membrana más utilizado en la concentración total de proteínas para la fabricación de queso (Mistry y Maubois, 2004), así como para la recuperación de componentes de la leche y su incorporación como nuevos ingredientes en diferentes formulaciones de productos lácteos (Pereira *et al.*, 2009), haciendo posible la concentración de proteínas no desnaturalizadas (Gésan-Guizieu, 2010). La tecnología UF separa de forma selectiva las macromoléculas que presentan un peso molecular de 1000 a 200 000 Da, del solvente y los solutos disueltos. En el caso de la leche, se produce, por un lado, un permeado que contiene agua, lactosa, minerales solubles, nitrógeno no proteico y vitaminas solubles en agua -por su capacidad de atravesar la membrana UF- y, por otro, un retenido en el que las proteínas, la grasa y las sales coloidales, que no pasan a través de la membrana, se incrementan en proporción a la cantidad de permeado eliminado (Mistry y Maubois, 2004; Nelson y Barbano, 2005). De esta forma se hace posible concentrar las proteínas lácteas y eliminar al mismo tiempo el exceso de agua y lactosa antes de la coagulación. Estas matrices altamente concentradas pueden coagularse con poca o ninguna producción de suero ácido (Nelson y Barbano, 2005), reduciendo o eliminando la necesidad de separar el suero de la cuajada durante el proceso de producción (Gésan-Guizieu, 2010). Masotti *et al.* (2017) reportan en su reseña que la industria láctea se ha beneficiado considerablemente de la tecnología de filtración de membrana debido a lo efectivo y económico que resulta su implementación, y a que generalmente es posible obtener un beneficio substancial en el rendimiento del queso (Kethireddipalli y Hill, 2015). Mediante esta tecnología ha sido posible la elaboración de diversos tipos de queso, entre los

que se encuentran mozzarella, cheddar, cottage, queso fresco, feta, camembert, brie, entre otros (Guinee *et al.*, 2006; Lipnizki, 2010; Agrawal y Hassan, 2007). Es importante destacar que los avances en esta tecnología se han enfocado principalmente en incrementar el rendimiento en la producción de queso y en el desarrollo de nuevas variedades de queso con propiedades y atributos novedosos, más que en duplicar las variedades de quesos tradicionales (Masotti *et al.*, 2017).

Diversos productos a base de proteínas lácteas concentradas, obtenidos mediante técnicas como la UF, se emplean como complemento en productos lácteos procesados de manera convencional, y en la fabricación de productos lácteos de imitación, lo que depende en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales (O'Regan *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012), y de las que puedan aportar al producto final. Este tipo de productos domina el mercado de proteínas gracias al alto grado de desarrollo de la industria láctea global y a la naturaleza fluida de la leche que facilita la producción de flujos de subproductos de gran valor añadido. Asimismo, presentan propiedades funcionales y beneficios para la salud respaldados por estudios médicos y científicos, lo que los convierte en una base nutricional apropiada para la aplicación en otros alimentos (Henchion *et al.*, 2017).

Los concentrados de proteína láctea (MPC, por sus siglas en inglés) hacen parte de este tipo de productos y se han empleado considerablemente como ingrediente en quesos procesados y de imitación. Los MPC son productos que contienen tanto caseínas como proteínas séricas, conservando la misma proporción en que se encuentran en la leche (Harvey, 2006); además, las caseínas están dispuestas en la misma conformación micelar que en la leche y las proteínas séricas también se encuentran en gran parte en su estado nativo (O'Regan *et al.*, 2009). Debido a que no existen estándares específicos de identidad en ningún país para este tipo de productos, se encuentran disponibles en una amplia gama de parámetros, incluyendo concentraciones que pueden variar del 35% a más del 85%, y diferentes características funcionales (Mistry y Maubois, 2004). El contenido de cenizas de los MPC es relativamente alto, debido a que los minerales ligados a las proteínas son retenidos (O'Regan *et al.*, 2009). El grado de concentración y las condiciones empleados durante el proceso de membrana definen la composición del MPC, así como la utilización de métodos complementarios en el proceso de elaboración de dichos productos, como es el caso de la pulverización, si el producto final se requiere en forma seca (Mistry y Hassan, 1991). Por lo anterior, es posible preparar diversos concentrados de proteína

de leche con contenidos de proteína, grasa, minerales y lactosa variables. Como el contenido proteico de estos concentrados en polvo es más alto que el de la leche desnatada en polvo, presentan mejores propiedades funcionales (Augustin y Margetts, 2003).

Debido a que los análogos lácteos de queso presentan un contenido importante de proteínas de la leche, en especial de caseínas, se hace posible la aplicación de agentes coagulantes para la elaboración del producto de imitación, confiriéndole incluso un carácter más semejante a un queso natural de coagulación enzimática. Por lo tanto, el uso de cuajo es posible también cuando se emplean retenidos UF o MPC como fuentes de proteína, ya que contienen caseínas en la misma disposición y proporción en que se encuentran en la leche fresca, como se mencionó anteriormente. En este sentido, varios autores han reportado que los MPC presentan propiedades de coagulación equivalentes a las de la leche, bajo condiciones similares de concentración de proteína y fuerza iónica (Famelart *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 2000; Panthi *et al.*, 2017). Estudios acerca de las propiedades reológicas de geles obtenidos a partir de MPC a diferentes concentraciones de proteína en comparación con leche desnatada reconstituida, elaborados por coagulación enzimática, reportaron que el tiempo de coagulación de los preparados con MPC era considerablemente menor, así como el módulo de almacenamiento superior, a los de la leche desnatada reconstituida. Además, se determinó que la relación α -CN: β -CN de los MPC fue un parámetro fundamental en la determinación de las propiedades reológicas de deformación de los geles con MPC (Ferrer *et al.*, 2008; O'Mahony *et al.*, 2009). También se ha investigado la elaboración de quesos procesados y de imitación a partir de un retenido UF rico en proteínas, empleando leche desnatada líquida pasteurizada, leche entera, MPC o leche reconstituida, para luego ser sometido a un proceso de proteólisis enzimática - mediante quimosina- con el fin de modificar la proteína. Los quesos resultantes pueden ser usados como ingrediente en pizzas congeladas y otros productos alimenticios. Asimismo, se informa acerca de la posibilidad de elaborar análogos de queso procesado para untar, con un porcentaje en materia seca de grasa del 43% y sustituyendo hasta un 30% de caseína de cuajo con MPC-85 (Kelly, 2011).

Estudios previos acerca de la elaboración de quesos de coagulación enzimática, incluidos en el presente trabajo, así como diversas publicaciones bibliográficas al respecto, dan cuenta de los efectos positivos de la aplicación de la *MTGasa* durante el proceso de producción, en diversos parámetros fisicoquímicos y funcionales del producto final. Escobar *et al.* (2014) reportaron que

la aplicación de *MTGasa* en la producción de queso Dambo tipo barra permitió mantener las características típicas del queso, junto con un incremento en la textura en comparación con el producto convencional, mejorando las características de loncheado del queso, un aspecto de gran interés para el productor. Otros autores también han reportado una mejora en las propiedades reológicas y de textura de quesos elaborados mediante coagulación enzimática (Yuksel *et al.*, 2011; Özer *et al.*, 2013), además de otros parámetros relevantes como una mejora en la capacidad de retención de agua y disminución de la sinéresis (Fernandes De Sá y Bordignon-Luiz, 2010; Domagała *et al.*, 2016) y la disminución de problemas asociados a la reducción de grasa en queso blanco iraní bajo en grasa (Danesh, 2018), además de incrementos significativos en el rendimiento del producto final (Cozzolino *et al.*, 2003; Bönisch *et al.*, 2008; Di Pierro *et al.*, 2010).

1.5 Objetivos

El presente trabajo se centró en la aplicación de la *MTGasa* producida por BDF Natural Ingredients, durante la elaboración tanto de quesos frescos como de un análogo, con la intención de obtener información acerca de las condiciones de aplicación de dicha enzima para incrementar el rendimiento quesero y/o la calidad del producto final. Concretamente, la *MTGasa* se aplicó en quesos de coagulación ácida (estrictamente ácido-enzimática, aunque debido a la poca adición de cuajo añadido durante su producción, se considerarán de tipo ácido) y de coagulación enzimática, en este último caso con distintos tipos de cuajos, así como de un análogo de queso fresco elaborado también con la adición de cuajo. Estos objetivos se concretaron en 3 capítulos distintos, cuyos objetivos específicos concretos se indican a continuación:

Capítulo 3. Objetivo: evaluar los efectos del tratamiento de leche fresca semidesnatada con diferentes niveles de *MTGasa* (0.2, 0.4 y 0.6 g MTG·L⁻¹) sobre el rendimiento quesero, la composición química y la textura de queso quark obtenido a través de un proceso ácido de coagulación. Además, analizar los cambios en el perfil electroforético como consecuencia del tratamiento con dicha enzima, así como sus efectos sobre la microestructura del queso.

Capítulo 4. Objetivo: determinar el efecto del tratamiento con *MTGasa* durante el proceso de elaboración de un tipo de queso fresco de coagulación enzimática utilizando 3 cuajos distintos (2 quimosinas producidas por fermentación de distinta marca comercial y un cuajo fúngico) y partiendo siempre de leche cruda. Concretamente, se estudió el efecto del momento de adición de la *MTGasa* tanto sobre las características del proceso (rendimiento) como de los quesos obtenidos (propiedades fisicoquímicas, textura y microestructura) y de los cambios a nivel molecular asociados a los tratamientos enzimáticos (perfil electroforético). Se ensayaron dos momentos de adición distintos: a) en una etapa de pre-incubación previa a la incorporación del cuajo, y b) añadida conjuntamente con este. Para ajustar los parámetros de proceso durante la elaboración de los quesos y profundizar en los efectos que conlleva la adición de *MTGasa*, fue necesario determinar previamente la cinética de coagulación de la cuajada para cada uno de los cuajos y estudiar cómo la adición de *MTGasa* afectaba dicha cinética.

Capítulo 5. Objetivo: elaborar y caracterizar análogos lácteos que se asemejaran a un tipo de queso fresco de coagulación enzimática, a partir de un concentrado de proteína de leche y de nata comercial utilizando dos cuajos distintos (una quimosina producida por fermentación y un cuajo fúngico), y evaluar el efecto de la adición de distintos niveles de *MTGasa* (1, 3 y 5 U·g⁻¹ proteína) durante el proceso de elaboración del queso sobre las características del producto final, especialmente en relación a su textura y a su capacidad de retención de agua.

CAPÍTULO 2.

MATERIAL Y MÉTODOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material

Para el estudio de los efectos del tratamiento con *MTGasa* en quesos de coagulación ácida, se empleó leche fresca semidesnatada de vaca (Puleva, LACTALIS PULEVA SL, Granada, España), pasteurizada a 79 °C durante 17 s, con pH 6.7 y un contenido de proteína y de grasa del 3.0% (p/v) y 1.6% (p/v), respectivamente. Una mezcla de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis*, y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (LC DC23, BDF Natural Ingredients S.L., Girona, España) se usó para preparar el cultivo iniciador (5 U·L⁻¹ de leche) como inóculo para la producción de queso (0.2% v/v); ninguna de estas cepas es productora de exopolisacáridos. Se utilizó como cuajo una aspartil-proteasa termosensible de *Rhizomucor miehei* (40 kDa), con una actividad de coagulación de la leche ≥ 220 IMCU·mL⁻¹ (Fromase® 220 TL BF, Royal DSM, Heerlen, Países Bajos).

Para el estudio del efecto del tratamiento con *MTGasa* en quesos de coagulación enzimática, se partió de leche de vaca cruda sin procesar, obtenida de una granja local en Girona (España) que fue pasteurizada posteriormente en el laboratorio. Para el proceso de coagulación de la leche, se emplearon tres preparaciones diferentes de cuajo: CHY-MAX® Powder Extra NB (Chr. Hansen Holding A/S, Hoersholm, Dinamarca), con una composición de quimosina al 100%, producida por fermentación (FPC) por *Aspergillus niger* var. *awamori* y una actividad enzimática de 2235 IMCU·g⁻¹; Maxiren® 180 (Royal DSM), cuya composición es también 100% FPC, pero en este caso derivada de *Kluyveromyces lactis*, con una actividad de coagulación de leche de 180 IMCU·mL⁻¹; y Fromase® 220 TL BF (Royal DSM).

Los análogos de queso de coagulación enzimática se obtuvieron a partir de un reconstituido lácteo, elaborado con concentrado de proteína láctea con un contenido del 65% de proteína (DairyTec MPC 65, Fayrefield Foods GmbH, Wasserburg, Alemania), nata de leche con un 38%

de materia grasa (Central Lechera Asturiana, Asturias, España) y agua destilada. Para la coagulación de estos, se usaron los cuajos CHY-MAX Powder Extra NB y Fromase® 220 TL BF.

Tanto para la elaboración de los quesos frescos, como de los análogos de queso, se utilizó la preparación comercial de *MTGasa*, Probind CH 2.0, provista por BDF Natural Ingredients SL, cuya formulación incluye proteínas de leche y lactosa, y cuya actividad enzimática se encuentra en un rango de 80 - 125 U·g⁻¹ de proteína, de acuerdo con las especificaciones del producto. En este trabajo, la concentración de enzima se reportará en términos de masa del producto comercial enzimático (MTG) relativa al volumen de leche (g MTG·L⁻¹), o bien de actividad específica (U·g⁻¹ de proteína). En cada caso, se reportará de una forma u otra y se especificarán las unidades equivalentes.

2.2 Elaboración de quesos de coagulación ácida tipo quark

El diagrama de flujo para la obtención de los quesos de coagulación ácida se muestra en la Figura 2.1, donde además se indican los análisis realizados en las distintas etapas y para cada tipo de muestra.

2.2.1 Obtención de la cuajada

Para cada tratamiento, 1.5 L de leche comercial semidesnatada pasteurizada fueron tratados térmicamente, a 90 °C durante 5 min, en un robot de cocina (Thermomix TM5, Vorwerk, Wuppertal, Alemania), bajo agitación suave (velocidad 2) e inmediatamente enfriados a 21 °C, en un baño de agua y hielo. Posteriormente, la leche fue inoculada con 3 mL del cultivo iniciador LC DC23, preparado tal y como se indicó anteriormente, y 50 µL de cuajo. Además, en las muestras tratadas con *MTGasa*, se añadió a la leche la cantidad requerida de preparación comercial para alcanzar una concentración final de 0.2, 0.4 o 0.6 g MTG·L⁻¹ (equivalentes a 0.7, 1.4 y 2.1 U·g⁻¹ de proteína, respectivamente), dependiendo del tratamiento. Todas las muestras fueron incubadas a 22 °C durante 16 - 20 h, hasta alcanzar un pH de 4.6, facilitando el desarrollo de la cuajada, y posteriormente se mantuvieron en condiciones de refrigeración, antes de continuar con el proceso de elaboración del queso.

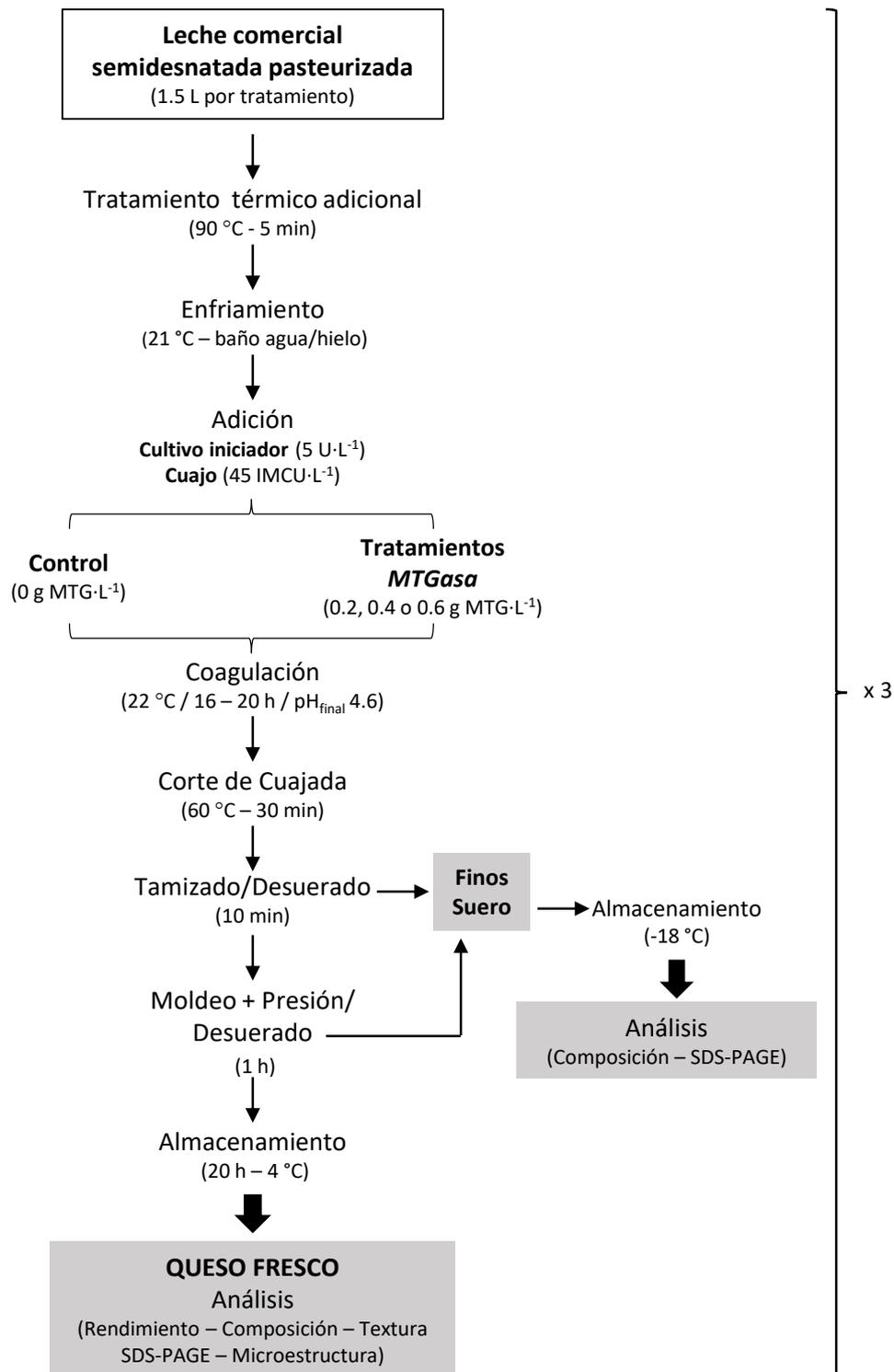


Figura 2.1. Diagrama de flujo para la obtención de los quesos de coagulación ácida tipo quark

2.2.2 Obtención del queso a partir de la cuajada

La cuajada fue cortada en cubos con un cuchillo y agitada en el robot de cocina en giro inverso, a baja velocidad y 60 °C durante 30 min, facilitando el desuerado y la inactivación del cultivo iniciador para evitar la post-acidificación. Posteriormente, la cuajada fue separada tanto de la fracción de finos como del suero, usando dos tamices de acero inoxidable, uno de 0.18 mm y otro de 0.074 mm (Filtración Vibración SL, Badalona, España), de manera que los finos se corresponden con la fracción retenida entre ambos tamices. Después de 10 min del proceso de separación, los finos y el suero fueron recuperados, pesados y almacenados en condiciones de congelación (-18 °C), para su posterior análisis. La cuajada fue servida en un paño quesero y transferida primero a moldes de desuerado (rejilla) y posteriormente a moldes plásticos (diámetro interno de 9.5 cm y altura de 6.5 cm; Ref. 3193, Industrias Plásticas Arroyo, Peñacastillo, España), presionada ($0.07 \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) durante 1 h y mantenida en refrigeración a 4 °C, durante 20 h, para obtener el queso quark. El queso fue pesado y almacenado en refrigeración y/o congelación, para su posterior análisis.

2.3 Determinación de las cinéticas de coagulación enzimática

Para la obtención de las cinéticas de coagulación de los cuajos, se pasteurizaron 700 mL de leche cruda de vaca (75 °C durante 20 s) utilizando un robot de cocina (Thermomix TM5, Vorwerk, Wuppertal, Alemania) manteniendo la agitación a velocidad 2 y giro normal. Una vez pasteurizada la leche, se enfrió en un baño de agua-hielo hasta una temperatura de 38-40 °C y se añadió CaCl_2 ($0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para el tratamiento Control, seguidamente se añadía el cuajo ($45 \text{ IMCU}\cdot\text{L}^{-1}$), removiendo durante 1 min. **A continuación, se repartía la mezcla en 13 tarrinas de 100 mL de polipropileno transparente, con diámetro de 5.5/7.4 cm y una altura de 3.5 cm, añadiendo aproximadamente 50 g en cada una de ellas, 12 de las cuales se colocaban inmediatamente en una estufa incubadora a 40 °C, mientras que la restante se utilizó para determinar la textura en el min 0 aplicando un test de extrusión con la ayuda de una sonda de malla TA-MP acoplada a un texturómetro CT-3 Texture Analyzer (AMETEK Brookfield, Middleboro, Massachusetts, EUA). Con las tarrinas mantenidas en la estufa incubadora se procedió a determinar la cinética de coagulación a lo largo del periodo de incubación (1 h), extrayendo una tarrina cada 5 min y determinando la textura, siguiendo el mismo protocolo de

medición. Para los tratamientos con *MTGasa* ($0.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de la preparación comercial Probind CH 2.0, correspondientes a $1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ de proteína), se procedía de manera distinta en función del momento de su incorporación. En el tratamiento MTG/C (tratamiento con *MTGasa* previo a la adición del cuajo), a la leche con CaCl_2 se le añadía la *MTGasa* y se incubaba a $38 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min para, a continuación, añadir el cuajo; en el caso del tratamiento MTG+C (adición conjunta de *MTGasa* y cuajo), se añadían ambas enzimas justo después de la incorporación de CaCl_2 . A partir de la incorporación del cuajo, en ambos casos se procedía de la misma manera que en el tratamiento Control (**).

2.4 Elaboración de quesos de coagulación enzimática

El diagrama de flujo para la obtención de los quesos de coagulación enzimática se muestra en la Figura 2.2, indicando además los análisis llevados a cabo en cada etapa distinta.

2.4.1 Obtención de la cuajada

Para la producción de cada queso obtenido por coagulación enzimática se partía de 1.2 L de leche cruda. La cuajada se preparaba siguiendo el protocolo indicado en el apartado 2.3, aunque sin repartirla en tarrinas.

2.4.2 Obtención del queso a partir de la cuajada

Transcurridos 30 min desde la adición del cuajo, se procedía al corte de la cuajada en el robot de cocina durante 1 min, seguido de un ciclo doble de incubación a $38 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min más agitación a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. Una vez finalizado, la cuajada se depositaba en moldes de desuerado (rejilla), permitiendo el drenaje durante 30 min por cada lado. Al servir la cuajada en los moldes, se situaban sobre un tamiz de acero inoxidable de 0.074 mm de Filtra Vibración SL, con el fin de retener la fracción de finos de caseína que no fue incorporada en la cuajada, y el suero resultante se recuperaba igualmente.

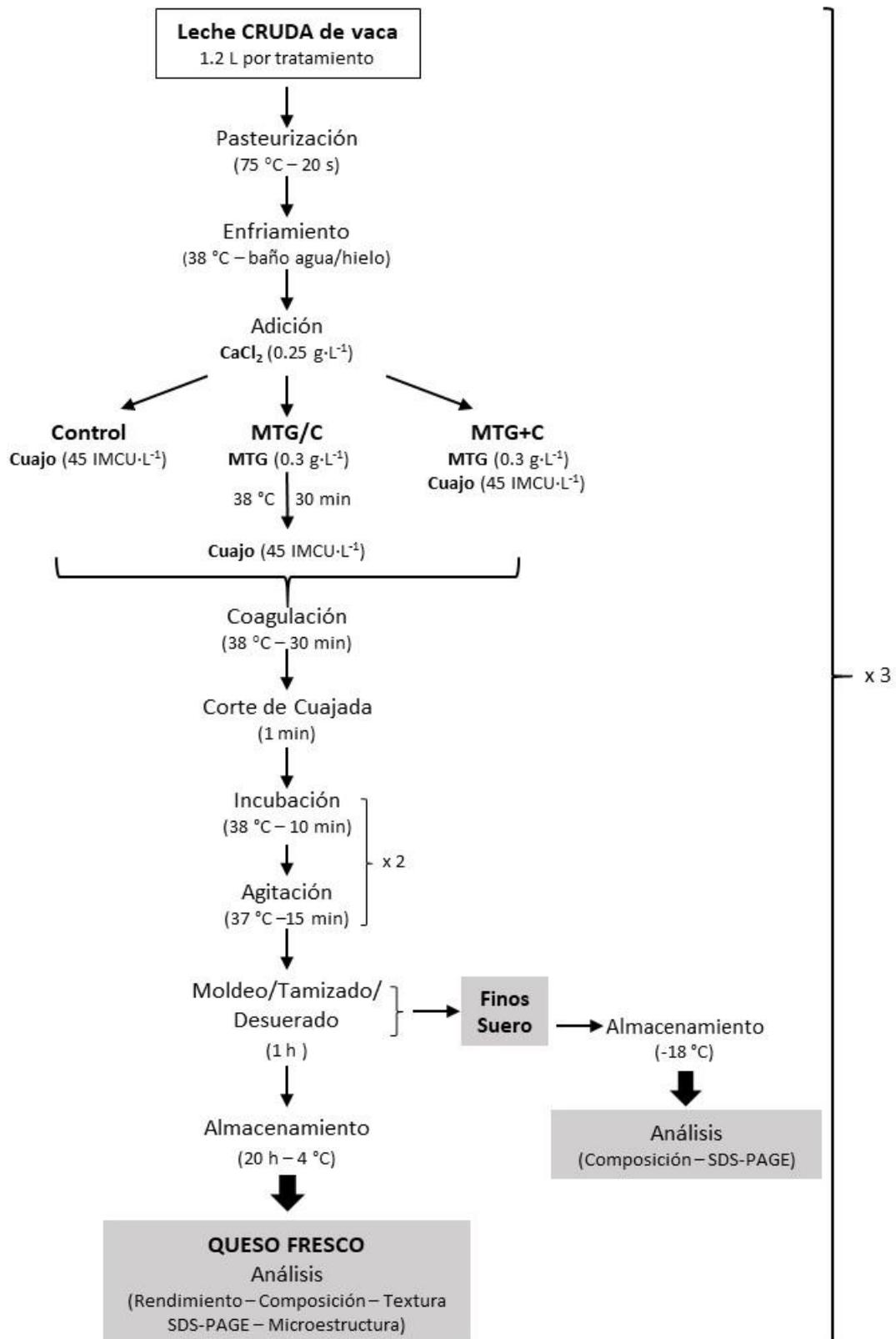


Figura 2.2. Diagrama de flujo para la obtención de quesos de coagulación enzimática. MTG/C: tratamiento con *MTGasa* previo a la adición de cuajo; MTG+C: adición conjunta de *MTGasa* y cuajo

De esta forma se conseguía separar y cuantificar los tres productos resultantes del proceso de elaboración del queso (suero, finos y cuajada). A continuación, los quesos eran conservados en refrigeración a 4 °C durante 20 h, y los finos y sueros eran congelados a -18 °C, antes de llevar a cabo los análisis correspondientes.

2.5 Elaboración de análogos de queso de coagulación enzimática

La preparación de 1 kg de queso análogo (Figura 2.3) partía de la mezcla de 450 g de agua y 390 g de nata de leche, en un robot de cocina (Thermomix TM5) durante 30 s, seguida de la adición de 160 g de MPC 65 y mezcla durante 90 s a velocidad 3. A continuación, se emulsionaba a 50 °C y velocidad 5, durante 5 min, para luego pasteurizar a 72 °C por 15 s a velocidad 2. La mezcla era luego llevada a un baño de agua-hielo para bajar la temperatura a 38 °C, y puesta nuevamente en el robot de cocina durante 1 min, a velocidad 3 y a una temperatura de 40 °C para la adición de 10 g de sal, en el caso de las muestras Control, y 10 g de sal y del preparado de *MTGasa* Probind CH 2.0 en las muestras tratadas con la enzima, de acuerdo con la concentración determinada para cada tratamiento (0, 1, 3 y 5 U·g⁻¹, equivalentes a 0, 1, 3 y 5 g MTG·kg⁻¹). Posteriormente, la mezcla era depositada en una botella para la adición del cuajo a una concentración de 50 IMCU·L⁻¹, y se agitaba manualmente durante 1 min para luego ser dividida en tarrinas plásticas (Ref. 130.11 - Garcia de Pou, Girona, España) de a 50 g cada una, las cuales eran incubadas a 38 °C durante 30 min permitiendo la coagulación del producto. Finalmente, las muestras eran conservadas en refrigeración a 4 °C, durante 20 h, previo a la realización de los análisis correspondientes.

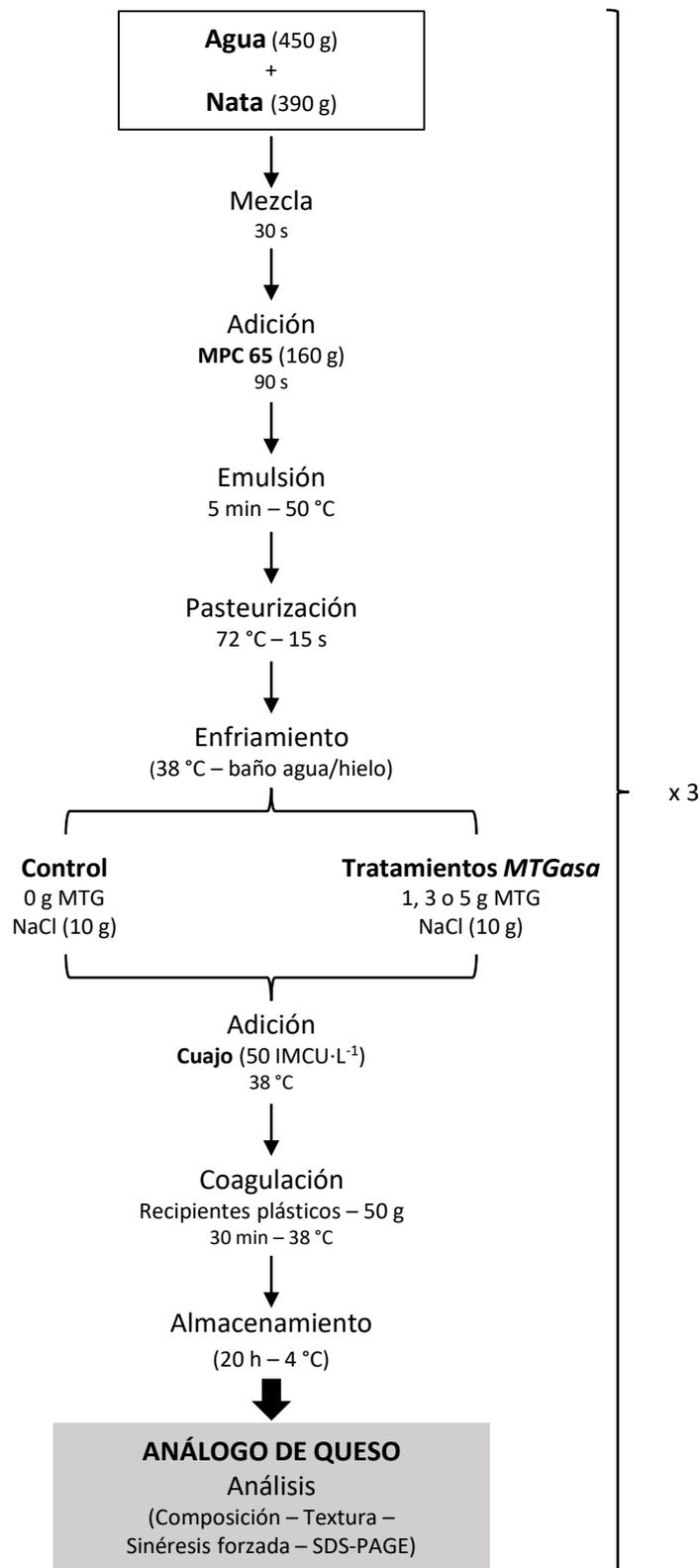


Figura 2.3. Diagrama de flujo para la obtención de análogos de queso a partir de concentrado de proteína de leche (MPC) y nata

2.6 Determinación del rendimiento quesero

El rendimiento quesero (R) fue calculado como la cantidad de queso (g) obtenido por 100 g de leche. Dicho cociente es referido como rendimiento en peso fresco (R-PF). La variación en el rendimiento para cada tratamiento enzimático en relación con el del queso Control se determinó a partir del cociente entre la diferencia de rendimientos entre ambos quesos y el rendimiento del queso Control, expresada también como porcentaje. A fin de obtener mayor información acerca de la calidad del queso, el rendimiento se expresó también como un porcentaje sobre la base de materia seca del queso (R-PS) cuando se creyó conveniente.

2.7 Análisis composicional de leche, suero, fracción de finos y queso

Se llevó a cabo un análisis químico proximal tanto de la leche utilizada en los distintos experimentos, como de cada grupo de muestras obtenidas por experimento y tratamiento (suero, fracción de finos y/o queso). Concretamente, se determinó el contenido de humedad, proteína, cenizas y/o calcio, en cualquier caso, por duplicado. Los contenidos de humedad y cenizas fueron determinados gravimétricamente de acuerdo con los métodos de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 2000). La proteína fue determinada multiplicando el contenido de nitrógeno total de Kjeldahl por 6.38 (AOAC 991.20). El contenido de calcio se determinó por espectroscopia de absorción atómica, después de haber sometido las muestras a calcinación (550 °C) y posterior hidrólisis ácida.

2.8 Análisis del perfil proteico: SDS-PAGE en condiciones reductoras

Las proteínas séricas y las caseínas, tanto de los quesos como de los análogos, fueron extraídas y separadas antes del análisis electroforético como se indica a continuación: 30 g del queso fueron mezclados con 30 g de agua Milli-Q usando una batidora MSM6500/03 (BSH Electrodomésticos España, S.A., Zaragoza, España). La mezcla homogeneizada fue enfriada a 10 °C después de ajustar el pH a 4.6 usando HCl 2 M, y centrifugada a 4500 rpm durante 20 min a 10 °C (Allegra® X-22 Series - Beckman Coulter, Inc, L'Hospitalet de Llobregat, España). Después de eliminar cuidadosamente la capa sólida de grasa de la superficie, el sobrenadante (suero) fue

recuperado y filtrado a través de un filtro jeringa Fisherbrand® de 0.45 µm (Fisher Scientific SL, Madrid, España). La fracción insoluble (caseínas) fue recuperada después de ser lavada con tampón sodio-acetato 0.5 M (pH 4.6) y centrifugada durante 15 min a 7000 rpm y temperatura ambiente, en tres ocasiones. Tanto el suero filtrado como la fracción caseínica fueron congelados a -18 °C durante 30 min y luego llevados a -80 °C durante otros 30 min antes de ser liofilizadas en un equipo CRYODOS-80 (Telstar, Terrassa, España).

A continuación, se añadió tampón fosfato 50 mM y tampón Laemmli 4X (Bio-Rad Laboratories Inc) para obtener soluciones con concentraciones de proteína finales de 0.75 µg·µL⁻¹ y 37.5 µg·µL⁻¹ para caseína y suero, respectivamente, para los quesos tipo quark; la concentración se incrementó para el caso de los quesos de coagulación enzimática y los análogos. Como agente reductor el tampón de carga contenía dithiothreitol (DTT) 200 mM, en una *ratio* 3:1 (muestra:tampón). Ambas soluciones fueron incubadas en estufa a 100 °C durante 5 min y enfriadas a 5 °C. Posteriormente, 20 µL de cada una de las muestras fueron cargadas en los pozos de los geles electroforéticos. Los geles (gel apilador 5% y gel separador 15%) se prepararon en el laboratorio usando una solución acrilamida/bis 29:1 de Bio-Rad Laboratories Inc. Como patrones de pesos moleculares se usaron los Precision Plus Protein TM Dual Color Standards (Bio-Rad Laboratories Inc.), con un rango de 10 a 250 kDa. La electroforesis se realizó inicialmente a 90 V durante 10 min, seguido de una segunda fase a 200 V durante 30 min. El gel resultante fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad Laboratories Inc.), en un agitador orbital Universal Shaker SM 30 C (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Alemania) a 75 rpm durante 10 min, y desteñido en una solución de ácido acético al 7% durante 24 h. Finalmente, los geles fueron analizados con el analizador de imágenes Molecular Imager Gel Doc XR System equipado con el *software* Quantity One 1-D Analysis (Bio-Rad Laboratories Inc.).

2.9 Análisis de textura

El análisis de textura de las muestras, tanto de queso como de análogos de queso, se llevó a cabo con un texturómetro AEMETEK CT3-10K (Brookfield Laboratories), utilizando una sonda de cilíndrica plana (15 mm de diámetro) de acero inoxidable para la aplicación de un test de penetración hasta una distancia de 4.0 mm a partir de la superficie del queso en aquellos de coagulación ácida, y 5.0 mm en los de coagulación enzimática y los análogos de queso, a una

velocidad de $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$. En el caso de los quesos se determinó su textura realizando 5 mediciones por queso, sin extracción de muestra, siempre después de retirar las muestras del refrigerador. A partir de la curva Fuerza-Tiempo se determinó la dureza, correspondiente a la fuerza máxima durante la penetración de la sonda, expresada en N. Para los análogos de queso se tomó solo una medida por queso sobre 6 quesos distintos. En este caso, además de la dureza, se determinaron los siguientes parámetros texturales a partir de la curva Fuerza-Tiempo: firmeza (fuerza a carga final, N); consistencia (trabajo realizado desde el comienzo del test hasta carga final, N·s); adhesividad (trabajo negativo para separar la sonda de la muestra, N·s); y la relación entre el trabajo durante la etapa de retirada de la sonda o “*upstream*” (TUp) y el trabajo positivo total durante el test de penetración (TT).

2.10 Sinéresis forzada

Para la determinación de la sinéresis forzada se empleó el método propuesto por Fort *et al.* (2007), ligeramente modificado, que consiste en la utilización de una pequeña cesta formada por un cilindro de PVC con una base de malla de poliéster, acoplada a un tubo de centrifuga. De la parte central del queso análogo, se extrajo una muestra cilíndrica de 2 mm de altura y 8 mm de diámetro, con la ayuda de un perforador metálico. La muestra fue pesada e introducida en la cesta de PVC, que a su vez fue suspendida dentro de un tubo de centrifuga de 50 mL. El conjunto fue centrifugado a $2000 \times g$ a $15 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 10 min ((SORVALL RC 5C Plus, Dupont, Newtown, USA) y posteriormente se pesó el líquido resultante del proceso. Cada muestra fue analizada de igual manera por triplicado y los resultados han sido reportados como porcentaje de agua liberada.

2.11 Análisis de la microestructura: Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La microestructura tanto de los quesos tratados con *MTGasa* como de los quesos Control fue examinada por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las muestras, consistentes de pequeños cubos de queso, fueron fijadas con glutaraldehído 2.5% (p/v) y cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4), a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2-4 h. Después de lavar, primero con tampón cacodilato y luego dos veces con agua destilada, las muestras fueron deshidratadas en etanol, sometiéndolas a una

serie de concentraciones en incremento del 50% al 100%. A continuación, fueron secadas al punto crítico, con CO₂ como fluido de transición en un equipo Emitech K850 CPD (EMIntegrated Technology, Kent, RU) y cubiertas con carbono en un Emitech K950 Turbo Evaporator. Las muestras fueron observadas bajo un microscopio Hitachi S-4100 FE-SEM (Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japón) y al menos dos imágenes representativas de cada aumento (×50, ×200, ×1000, ×5000 y ×10 000) fueron tomadas para cada muestra. Finalmente, se empleó el *software* Quartz PCI (Quartz Imaging Corporation, Vancouver, Canadá) para adquirir y procesar las imágenes digitales.

2.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue llevado a cabo con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics version 23.0 para Windows (IBM SPSS Statistical software Inc., Chicago, IL, EUA). En todos los casos, los datos fueron analizados con el método ANOVA, utilizando el procedimiento de modelo lineal general (Proc GLM). Cuando se obtuvo un efecto significativo, se aplicó un contraste polinómico en caso de ser apropiado; de lo contrario, se aplicó el test de separación de medias de Tukey para su comparación. El nivel de significación para todas las pruebas fue de $\alpha=0.05$.

CAPÍTULO 3.

EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (*MTGasa*) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE QUESOS DE COAGULACIÓN ÁCIDA TIPO QUARK

El objetivo de esta primera parte del trabajo fue evaluar los efectos del tratamiento de leche fresca semidesnatada, con diferentes concentraciones de transglutaminasa microbiana (*MTGasa*), en el rendimiento, la composición química y la textura de queso quark, obtenido a través de un proceso de coagulación ácida, además de evaluar el impacto sobre su microestructura y los cambios en el perfil electroforético de la fracción proteica del queso, con el fin de establecer una relación entre los efectos observados y la aplicación de dicha enzima.

3.1 Diseño Experimental

Se aplicó un diseño en bloques completos al azar, considerando los días experimentales (3) como bloques, para determinar los efectos de la concentración de *MTGasa* sobre: a) el rendimiento quesero, cuantificando las pérdidas de suero y la fracción de finos por separado, como una valoración de la eficiencia del proceso de fabricación; b) las características fisicoquímicas del suero, finos (cuando aplicó) y queso; c) los perfiles proteicos de los quesos obtenidos mediante la técnica SDS-PAGE en condiciones reductoras; d) la textura del queso; y e) la microestructura del queso. Se emplearon 6 L de leche por experimento, para ensayar tres concentraciones diferentes de *MTGasa* (0.2, 0.4 y 0.6 g MTG·L⁻¹, correspondientes a 0.7, 1.4 y 2.1 U·g⁻¹ de proteína, respectivamente), junto con el tratamiento Control (0 g MTG·L⁻¹).

3.2 Resultados y discusión

3.2.1 Efecto del tratamiento térmico

La leche comercial fresca pasteurizada (79 °C durante 17 s) usada en el estudio, fue sometida a un tratamiento térmico adicional más severo (90 °C durante 5 min) en el laboratorio, antes de comenzar el proceso de producción de queso, suficientemente intenso como para destruir un

inhibidor de la *MTGasa*, termolábil y de bajo peso molecular (200-250 Da), presente de manera natural en la leche bovina (De Jong *et al.*, 2003).

Los tratamientos a altas temperaturas suelen ser aplicados en la fabricación de quesos frescos de cuajada ácida antes de la fermentación, para incrementar el rendimiento del queso, ya que provoca la desnaturalización de las proteínas séricas, lo cual favorece la agregación mediante enlaces disulfuro, tanto entre proteínas séricas, como entre proteínas séricas y la κ -CN, en este caso a través de reacciones de intercambio -SH/S-S, aunque también pueden contribuir las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Dannenbergh y Kessler, 1988; Lucey *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2017b). En este contexto, se ha atribuido un papel clave a la β -lactoglobulina, debido a que esta proteína contiene una cisteína libre, además de dos puentes disulfuro, que quedan expuestos después del tratamiento térmico (Lelièvre, 1995), mientras que en la α -lactoalbúmina únicamente están presentes los puentes disulfuro. Es por ello que, las interacciones entre proteínas del suero desnaturalizadas y las micelas de caseína, se producen de manera particular entre β -lactoglobulina y κ -CN, dando como resultado tanto complejos solubles como complejos unidos a micelas (Donato y Guyomarc'h, 2009).

Sin embargo, los tratamientos térmicos de la leche tienen efectos muy diferentes en cuajadas acidificadas, cuajadas con cuajo y cuajadas con una combinación de ambos, debido a las diferencias en los mecanismos de coagulación, siendo dichos tratamientos más adecuados para procesos en los cuales la coagulación ácida es dominante sobre la acción del cuajo y donde no se requiere un drenaje extenso. En este tipo de quesos, el ácido neutraliza las cargas negativas alrededor de las micelas de caseína propiciando la agregación, incluso en el caso de que hayan incorporado proteínas séricas. Sin embargo, la interacción covalente entre la κ -CN -el sustrato de la quimosina- y la β -lactoglobulina puede implicar un deterioro de las propiedades de coagulación del cuajo, inhibiendo la fase primaria de la coagulación que implica la modificación enzimática de las micelas de caseína. Esto parece ser el resultado de un efecto sinérgico de impedimento estérico, debido a la modificación de la superficie de las micelas de caseína por calor, y la formación de complejos solubles de proteínas séricas- κ -CN (Calvo *et al.*, 1995; Kethireddipalli *et al.*, 2010). En consecuencia, esta interacción proteica implica tiempos de coagulación más largos y estructuras de cuajada más débiles.

En este sentido, diferentes autores también han demostrado que, mientras que la *MTGasa* presenta un efecto menor en el entrecruzamiento de proteínas en la leche no tratada, cuando se usa leche precalentada, se logra un grado considerable de interacción enzimática de proteínas, debido al despliegue de estas (Sharma *et al.*, 2001; Rodríguez-Nogales, 2006).

3.2.2 Rendimiento quesero

La eficiencia en la elaboración de queso puede ser determinada mediante diferentes índices. El más sencillo y empleado es el rendimiento del queso, expresado como kg de queso por 100 kg de leche (porcentaje de rendimiento en peso fresco o R-PF), debido a su relevancia desde el punto de vista de los productores, ya que se trata de un concepto clave para mejorar la economía en la producción quesera. A fin de obtener información acerca de la calidad del queso, también se puede usar un enfoque complementario, considerando el contenido de materia seca del queso relativo al peso de la leche (porcentaje de rendimiento en peso seco o R-PS).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el R-PF se incrementó significativamente ($p < 0.05$) cuando la leche fresca semidesnatada fue tratada con *MTGasa* (rango de concentraciones evaluado: 0.2 - 0.6 g MTG·L⁻¹), en comparación con el tratamiento Control. De acuerdo con la Figura 3.1, parece evidente un aumento proporcional en el R-PF junto con la concentración de enzima. De hecho, el contraste polinomial aplicado demostró la existencia de una tendencia lineal significativa ($p < 0.05$), entre la concentración de MTG y el R-PF. Los resultados del test de separación de medias de Tukey también fueron consistentes con este comportamiento. Específicamente, el incremento en el rendimiento expresado en porcentaje relativo al rendimiento del Control fue de 5±3%, 13±4% y 19±6%, desde la concentración de enzima aplicada más baja, a la más elevada; una mejora importante si se considera que, aumentos tan pequeños como del 0.1% sobre la producción anual, tienen un gran impacto en el éxito económico (McSweeney, 2007). Bohdziewicz *et al.* (2010) reportaron incrementos del 10 - 15% en el rendimiento de la producción de queso tvarog (quark) tratado con *MTGasa*, confirmando una retención más alta de proteínas séricas, y algunos cambios fisicoquímicos en los quesos tratados, sin la necesidad de hacer cambios significativos en el proceso de elaboración del queso para la incorporación de la enzima. Otros autores también han observado que, la aplicación de *MTGasa* durante la elaboración de quesos de coagulación ácida (con o sin

la adición de una pequeña cantidad de cuajo), provoca un incremento en el rendimiento de producción, dependiente de la concentración de enzima (Cozzolino *et al.*, 2003; Mazuknaite *et al.*, 2013).

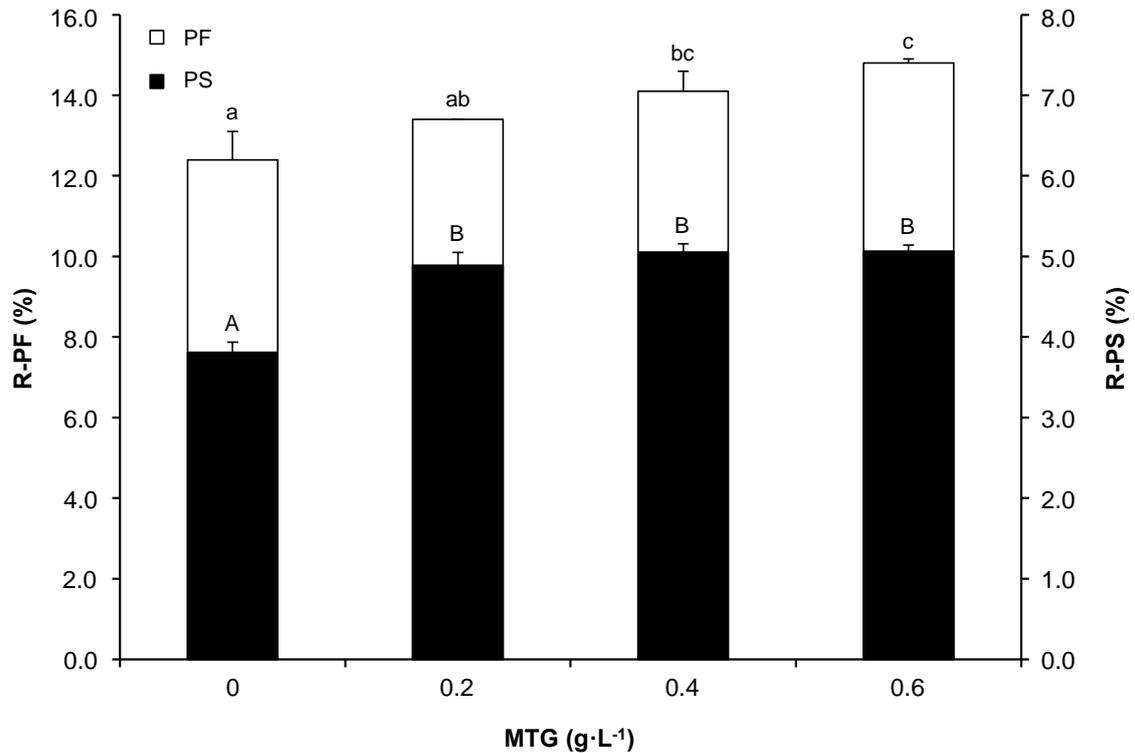


Figura 3.1. Rendimiento (R) del queso en función de la concentración de MTG aplicada durante el proceso de elaboración de queso quark: en términos de peso fresco (PF, en blanco); y en términos de peso seco (PS, en negro). Medias \pm SD (n=3). Diferentes letras minúsculas y mayúsculas indican diferencias significativas en R-PF y R-PS, respectivamente, entre los tratamientos según el test de separación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$)

Este comportamiento contrasta de manera importante con el observado cuando el rendimiento del queso es expresado en términos de peso seco. Aunque los quarks tratados con *MTGasa* mostraron valores significativamente ($p < 0.05$) más altos de R-PS que los quesos Control, no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en función de la concentración enzimática aplicada, indicando que el porcentaje de sólidos recuperados (proteínas y/o grasa) era independiente de dicho parámetro. Los resultados también sugieren que las diferencias en el incremento de R-PF entre los distintos tratamientos con *MTGasa* fueron debidas a una mayor retención de agua a medida que aumentaba la concentración de MTG; sin embargo, cabe

señalar que la cantidad de agua retenida en los quesos tratados enzimáticamente resultó en cualquier inferior a la del tratamiento Control. Aunque el hecho de añadir una cierta cantidad del preparado comercial de *MTGasa* conlleve un pequeño aumento del contenido de sólidos en el producto inicial, el hecho de que el incremento en el rendimiento expresado en términos de peso seco, en los tratamientos con la enzima, sea independiente de la concentración de MTG añadida, garantiza que el aumento no es debido principalmente a la adición de preparado.

Más allá de las diferencias en el rendimiento del queso, se observaron claramente cambios en el patrón de comportamiento entre los tratamientos, tanto durante el desuerado de la cuajada, como en las etapas posteriores de procesamiento del queso. Como se observa en la Figura 3.2, se obtuvieron cantidades significativamente ($p < 0.05$) mayores de suero después del proceso de corte de la cuajada en muestras tratadas con *MTGasa*, independientemente de la concentración específica de enzima aplicada. En contraste, los tratamientos enzimáticos implicaron una reducción drástica y significativa ($p < 0.05$) en la cantidad de finos recuperados después de la filtración de la cuajada. En todas las muestras tratadas con *MTGasa*, la fracción de finos representó menos del 1% del peso de leche usado, mientras que en las muestras Control el valor obtenido fue de alrededor del 8%.

Teniendo en cuenta estos datos, junto con los correspondientes al rendimiento de producción, fue posible calcular las pérdidas no controladas durante el proceso de elaboración del queso, constituidas principalmente por el suero eliminado durante la etapa de prensado de la cuajada, y los granos de cuajada separados ineficazmente del paño quesero. Como se puede observar en la Figura 3.2, durante el proceso de elaboración del queso Control se obtuvieron valores significativamente ($p < 0.05$) más altos de pérdidas no controladas, debido particularmente a una naturaleza más pegajosa de la cuajada. Minimizar estas pérdidas a través de la actividad de la *MTGasa* podría ser realmente interesante para las industrias productoras de queso, con el fin de mejorar su rentabilidad.

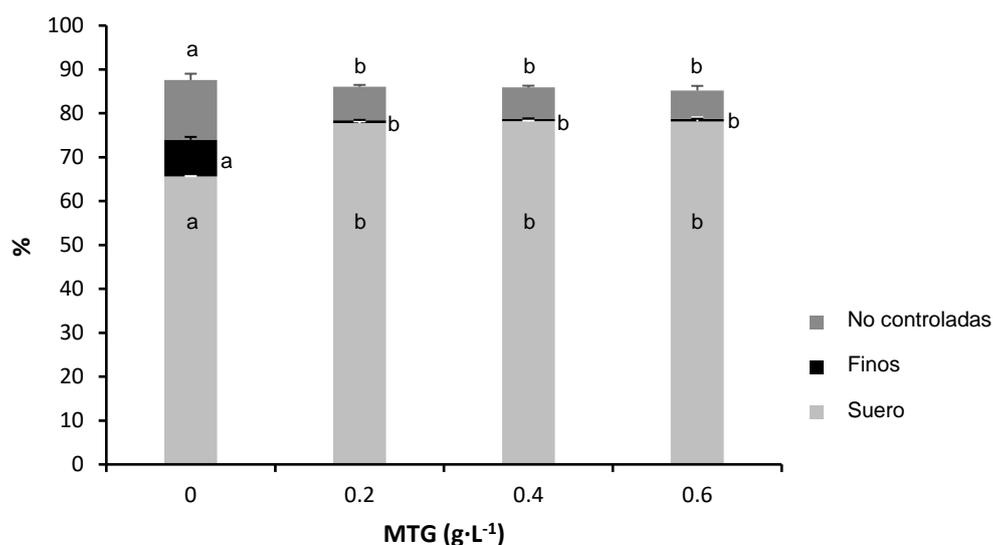


Figura 3.2. Porcentaje (p/p) de pérdidas no controladas, finos y suero durante el proceso de elaboración del quark en función de la concentración de MTG. Medias \pm SD (n=3). Las medias dentro de la misma fracción, con diferentes letras minúsculas, son significativamente diferentes según el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

3.2.3 Análisis composicional de suero y fracción de finos

Es importante señalar que, no solo se obtuvieron diferencias en las cantidades de suero generadas -expresadas en porcentaje de leche empleada- entre el Control y las muestras tratadas enzimáticamente, sino también en su composición química, específicamente en relación con los contenidos de humedad y proteína (Tabla 3.1). Los resultados muestran una reducción y un incremento significativos ($p < 0.05$) en el contenido de proteína y de agua, respectivamente, en sueros procedentes de la elaboración de quesos tratados con *MTGasa*, en comparación con las muestras Control. Además, los efectos del tratamiento con *MTGasa* en relación con la fracción de suero, en cuanto a la cantidad generada y a su composición, fueron independientes de la concentración de enzima. En este contexto es importante señalar que, considerando el porcentaje de suero y los datos de composición del suero conjuntamente, se obtuvo que, no solo los tratamientos enzimáticos, sino también los tratamientos Control, son semejantes respecto a la cantidad de proteína perdida expresada como porcentaje de leche ($0.46 \pm 0.01\%$, $0.45 \pm 0.04\%$, $0.47 \pm 0.07\%$ y $0.44 \pm 0.04\%$ para 0, 0.2, 0.4 y 0.6 g MTG·L⁻¹, respectivamente).

Tabla 3.1. Composición química de suero y de finos, dependiente de la concentración de MTG empleada durante la producción del queso. Medias \pm SD (n=3). Para el suero, las medias dentro del mismo parámetro con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes en función de la concentración de MTG, según el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

FRACCIÓN	MTG (%)	H ₂ O (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Calcio (mg·100 g ⁻¹)
Suero	0	94.05 \pm 0.74 a	0.91 \pm 0.19 a	0.72 \pm 0.02	116.7 \pm 25.5
	0.2	94.48 \pm 0.59 b	0.57 \pm 0.05 b	0.63 \pm 0.08	121.4 \pm 7.4
	0.4	94.48 \pm 0.60 b	0.58 \pm 0.09 b	0.65 \pm 0.02	104.3 \pm 7.7
	0.6	94.51 \pm 0.48 b	0.57 \pm 0.07 b	0.66 \pm 0.04	113.9 \pm 25.9
Finos	0	82.32 \pm 1.05	9.04 \pm 0.92	0.62 \pm 0.12	124.8 \pm 16.1

La leche usada en este estudio contenía 106.6 ± 5.5 mg Ca·100 g⁻¹, coincidiendo con los valores citados en la literatura (Farran *et al.*, 2004). Únicamente alrededor de un tercio del calcio de la leche es soluble, viéndose este contenido reducido después del calentamiento de la leche, particularmente cuando la temperatura está por encima de los 90 °C (Pouliot *et al.*, 1989). Sin embargo, durante la coagulación ácida, la mayor parte del calcio es solubilizado y removido con el suero cuando el pH es reducido a 5.1, a una temperatura superior a los 22 °C, independientemente de si la leche ha sido sometida previamente a un tratamiento térmico o no, con valores reportados en la literatura de alrededor del 80% (Carbonaro *et al.*, 2000). En el presente estudio, entre un 70-90% del calcio de la leche se perdió a través del suero, sin diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, incluyendo el Control. Este hecho es importante debido a que el calcio juega un rol significativo en la mejora del rendimiento del queso (Lucey y Fox, 1993); si no hay suficiente calcio presente en la leche, la cuajada tiende a ser suave, incrementando de esta manera las pérdidas de finos.

El análisis composicional de la fracción de finos se muestra solo para las muestras Control (Tabla 3.1), debido a la baja cantidad de finos obtenida en los quesos producidos con *MTGasa*, como ya se ha indicado anteriormente. En el caso de los quesos Control, se detectaron diferencias importantes y significativas ($p < 0.05$), al comparar la composición de finos y suero, específicamente con respecto a los contenidos de agua y proteína. Los resultados evidencian que 0.75 ± 0.07 g de proteína se perdieron a través de los finos, por cada fracción de 100 g de leche usada en el tratamiento Control, en otras palabras, el 25% de las proteínas de la leche.

Este porcentaje puede resultar muy alto, considerando que el tratamiento térmico aplicado a la leche en el presente estudio, antes de su uso, es lo suficientemente intenso como para provocar la desnaturalización de prácticamente todas las proteínas del suero (Kessler, 1996) y, por tanto, favorecer su incorporación en la cuajada, gracias a la interacción principalmente con κ -CN (Guyomarc'h *et al.*, 2003; Donato *et al.*, 2007). Sin embargo, no todas las proteínas séricas se unen a la micela de caseína después del calentamiento de la leche; una fracción considerable puede formar agregados con otras proteínas del suero. Análisis electroforéticos realizados a la leche tratada térmicamente que se empleó en este estudio (datos no incluidos), concuerdan completamente con este comportamiento. Algunos autores mantienen que el pH de la leche pre-tratada puede representar un papel importante en la determinación de las interacciones involucradas. A $\text{pH} < 6.6$, todas las proteínas séricas desnaturalizadas durante el calentamiento se unen a la superficie de la micela de caseína, mientras que a $\text{pH} > 6.6$ los agregados de proteína también están presentes en la fracción sérica (Vasbinder y De Kruif, 2003). Este comportamiento estaría de acuerdo con el pH de la leche utilizada en este estudio (6.7).

3.2.4 Análisis composicional del quark

De la información contenida en la Figura 3.3 y en la Tabla 3.2, se puede afirmar que el contenido de agua, proteína y calcio de los quesos quark Control obtenidos en este estudio, son consistentes con los reportados en la bibliografía para queso fresco (Fox *et al.*, 2017b). De manera interesante, la Figura 3.3 también muestra que los contenidos de agua y proteína del quark fueron significativamente ($p < 0.05$) modificados como consecuencia del tratamiento enzimático. El análisis estadístico aplicando un contraste polinomial, evidencia una relación cuadrática significativa ($p < 0.05$) entre cada uno de estos parámetros y la concentración de MTG, pero, mientras que para el caso del contenido de agua se obtuvo una parábola en forma de U, para el contenido de proteína se observó en forma invertida. Kulozik *et al.* (2003) obtuvieron resultados similares en la producción de queso fresco tradicional lituano tipo cottage, por coagulación ácida, y, como posible explicación para dicha distribución de proteína en las diferentes fases señalan que, en el caso del entrecruzamiento de micelas de caseína, las proteínas séricas desnaturalizadas pueden actuar como coloide protector, facilitando la integración de proteínas en la matriz de cuajada. Así mismo, las proteínas séricas podrían quedar retenidas en la red formada por agregación de las micelas de caseína y, en consecuencia, la

estructura compacta puede verse alterada, resultando en un ligero incremento en el contenido de proteína del queso.

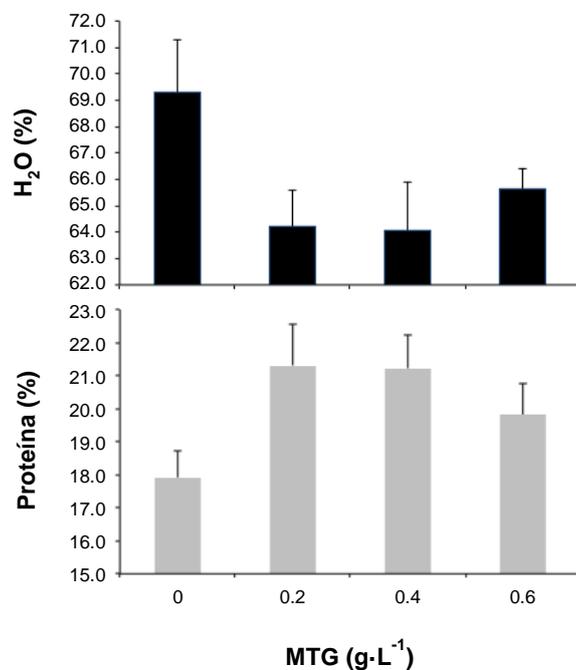


Figura 3.3. Contenido de agua (arriba) y de proteína (abajo) del quark, como una función de la concentración de MTG empleada en el proceso de producción. Medias \pm SD (n=3)

No se obtuvieron diferencias significativas ($p>0.05$) en relación con los contenidos de cenizas y calcio de los quesos elaborados, según los distintos tratamientos aplicados, incluyendo el tratamiento Control (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Contenido de cenizas y calcio en las muestras de quark, como función de la concentración de MTGasa. Medias \pm SD (n=3)

MTG (g·L ⁻¹)	Cenizas (%)	Calcio (mg·100 g ⁻¹)
0	0.76 \pm 0.14	87.3 \pm 10.4
0.2	0.77 \pm 0.25	73.1 \pm 19.0
0.4	0.80 \pm 0.21	78.7 \pm 20.3
0.6	0.76 \pm 0.10	83.4 \pm 25.1

3.2.5 Perfil proteico

Los efectos del tratamiento de leche precalentada con diferentes concentraciones de *MTGasa*, se ven reflejados en los perfiles SDS-PAGE obtenidos bajo condiciones reductoras, tanto para los quesos Control, como para aquellos tratados enzimáticamente (Figura 3.4). En el gel que muestra el perfil de las proteínas séricas del quark (Figura 3.4a), la banda correspondiente a la β -lactoglobulina presenta muy poca intensidad, incluso en el tratamiento Control aun cuando su presencia es mayor en relación con los tratamientos enzimáticos, entre los cuales es difícil definir un patrón de comportamiento en función de la concentración de enzima. Por el contrario, la banda correspondiente a la α -lactoalbúmina tiende a ser más evidente en las muestras tratadas con enzima en comparación con las del Control, mostrando una relación positiva con la concentración de enzima.

El entrecruzamiento covalente de proteínas lácteas inducido por la *MTGasa*, se hizo evidente al comparar la fracción caseínica de los quesos Control, con las de los quesos tratados enzimáticamente (Figura 3.4b). Estos cambios se presentaron además en una relación dependiente de la concentración, con las bandas correspondientes a las caseínas - especialmente la β -CN- desapareciendo progresivamente, junto con la aparición de nuevas bandas en el extremo superior del gel de electroforesis, representando polímeros de proteína formados por el entrecruzamiento catalizado por la enzima, con un peso molecular relativamente alto. En este punto, es relevante mencionar que algunos de los nuevos polímeros formados fueron incapaces de entrar, ya no solo en el gel separador, sino incluso en el apilador (información no mostrada). Esta es la razón detrás de la aparente menor presencia de polímeros de nueva formación, observada a medida que aumenta la concentración de enzima. La insolubilidad de dichos polímeros bajo condiciones reductoras confirmó la contribución de las interacciones covalentes no-disulfuro en su formación, es decir, la participación de la *MTGasa*. Las caseínas son un excelente sustrato para la *MTGasa* (O'Connell y Kruif, 2003; Bönisch *et al.*, 2007); sin embargo, la κ - y β -CNs son las más susceptibles de ser entrecruzadas por la acción de la *MTGasa*, debido a la localización en la superficie micelar, en el primer caso y, a la naturaleza dinámica, en el segundo (Sharma *et al.*, 2001).

Otros autores han reportado previamente resultados similares. En ensayos con leche tratada con cantidades crecientes de *MTGasa*, Cozzolino *et al.* (2003) obtuvieron perfiles SDS-PAGE en

condiciones reductoras de las proteínas totales de la leche, con un aumento gradual en la cantidad de polímeros de alto peso molecular que no penetraban en el gel apilador, al mismo tiempo que disminuían progresivamente las bandas correspondientes a las caseínas y proteínas séricas. Además, en el perfil electroforético de las proteínas del suero observaron una disminución progresiva con el aumento de concentración de *MTGasa*, sugiriendo la incorporación de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina en las caseínas de la cuajada, junto con el aumento progresivo en el rendimiento de los quesos por acción de la enzima.

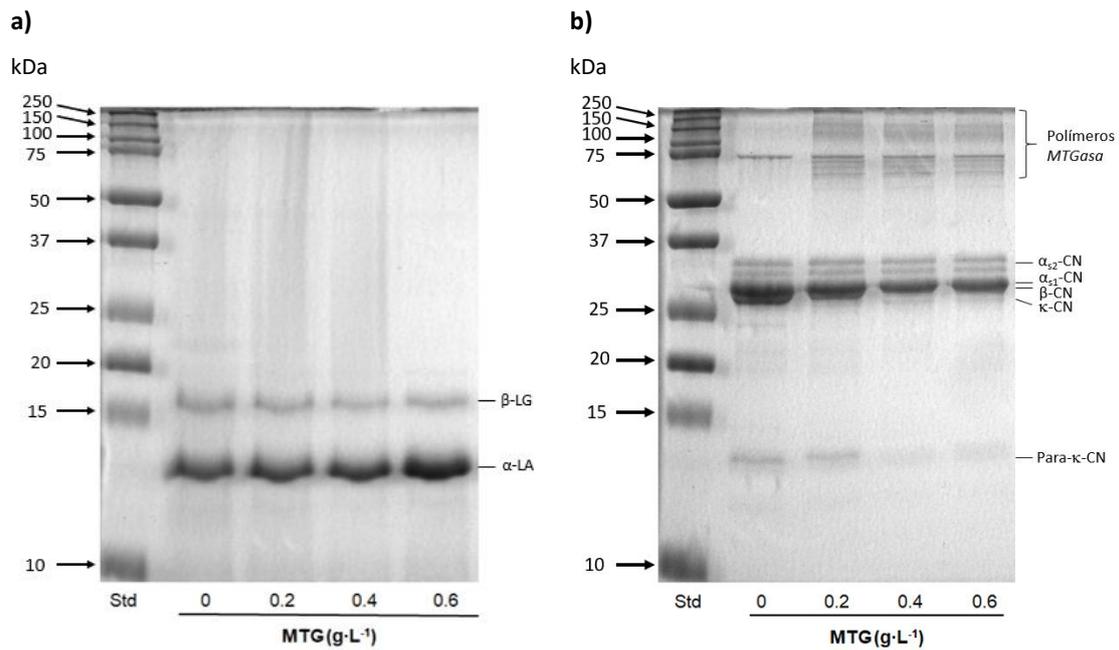


Figura 3.4. Perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras de las fracciones sérica (a) y caseínica (b) de los quarks, sometidos a tratamientos con *MTGasa* a diferentes niveles (0 - 0.6 mg·L⁻¹). Std: patrones de peso molecular

3.2.6 Microestructura del queso

En la bibliografía se encuentran reportados datos de estudios microestructurales que indican la estabilización de la estructura en quesos tratados con *MTGasa*, debido a los entrecruzamientos covalentes de las proteínas, mostrando una microestructura completamente homogénea, con una red más fina, poros y agregados más pequeños, y una porosidad más baja (Lim *et al.*, 2011; Domagala *et al.*, 2016). En el presente estudio, la microestructura de los quarks preparados con y sin adición de diferentes concentraciones de *MTGasa* estarían de acuerdo con estos autores (Figura 3.5). Las micrografías correspondientes a los quesos Control muestran una matriz

parcialmente estructurada, con cadenas delgadas y pequeños poros, lo que estaría de acuerdo con la alta capacidad de retención de agua atendiendo al contenido de humedad, pero mostrando cierta heterogeneidad en su compactibilidad a través del perfil. En contraste, después del tratamiento de la leche con 0.2 y 0.4 g MTG·L⁻¹, la red proteica experimenta cambios relevantes, presentando una matriz más estructurada, con la formación de cadenas de agregados proteicos más gruesas, en una relación dependiente de la concentración de la enzima, y mostrando modificaciones en el patrón de porosidad, con poros más evidentes. Por lo tanto, la *MTGasa* parece ser capaz de mejorar la microestructura del queso al modificar el patrón de gelificación a través de su actividad de entrecruzamiento. En trabajos similares, en los cuales se estudiaron la reología y la estructura de geles de leche desnatada acidificados químicamente (glucono- δ -lactona), con y sin adición previa de *MTGasa*, Færgemand y Qvist (1997) también encontraron que los geles tratados enzimáticamente tenían permeabilidades mucho más bajas que los geles no tratados, con una microestructura con poros más pequeños y mucho más fina. Estos cambios en la microestructura del queso, en función de la concentración de *MTGasa* añadida durante el proceso de elaboración del queso, estarían relacionados con un grado de entrecruzamiento diferente, lo que también tendría un efecto positivo en relación con la sinéresis (Færgemand y Qvist, 1997; Dmytrów *et al.*, 2010). Además, los geles de proteína láctea elaborados tradicionalmente se estabilizan en gran medida a través de interacciones no covalentes, mientras que la adición de *MTGasa* cataliza la formación de enlaces covalentes entre proteínas. La introducción de estos nuevos enlaces conlleva a la formación de geles con una estructura completamente diferente, como las reportadas anteriormente (Schorsch *et al.*, 2000).

Sin embargo, con la adición de 0.6 g MTG·L⁻¹, la microestructura parece ser más compacta que a concentraciones de enzima más bajas, siendo semejante a la de los quesos Control, aunque más uniforme. Esto podría indicar un efecto de sobredosificación de la *MTGasa*, que explica igualmente cambios en otros parámetros del quark en relación con los dos quesos elaborados con dosis menores de la enzima.

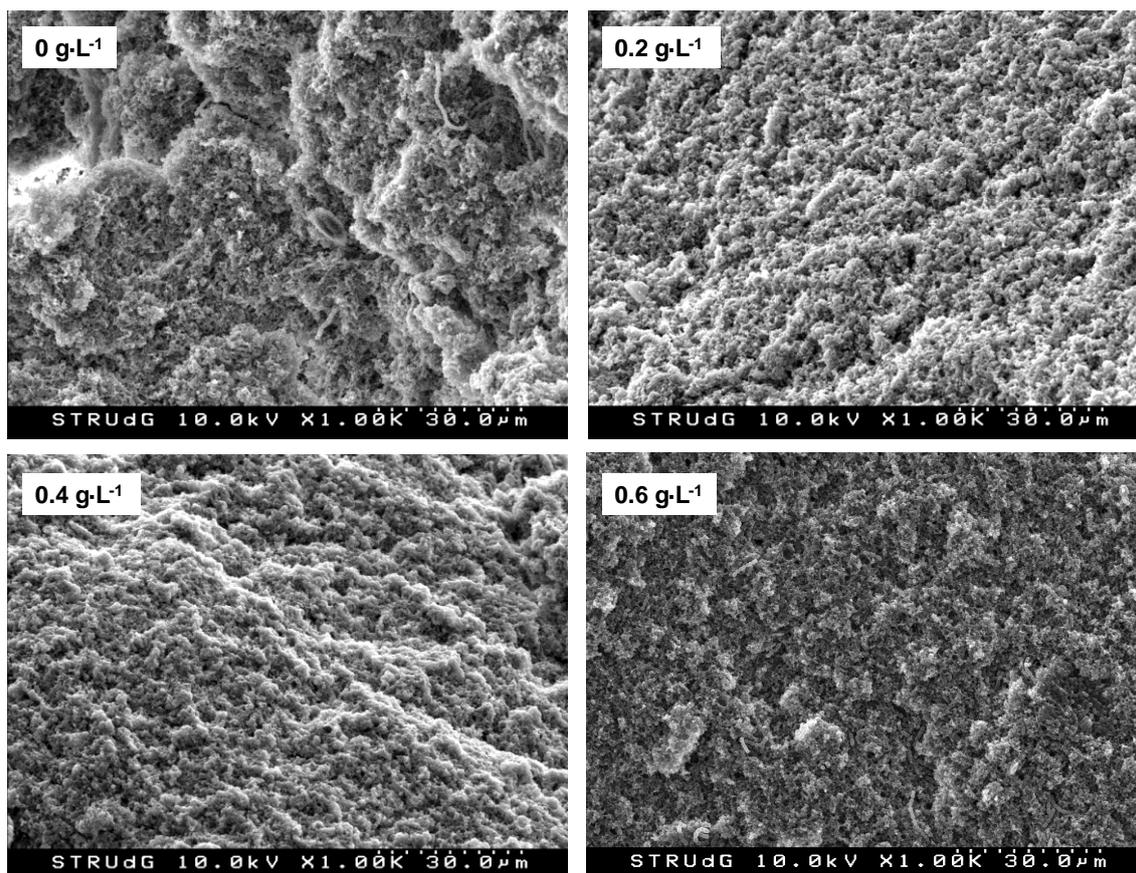


Figura 3.5. Micrografías en microscopía electrónica de barrido, mostrando el efecto del tratamiento de leche para la producción de queso con *MTGasa* a diferentes concentraciones, en la microestructura de los quarks

3.2.7 Textura

Como Gharibzahedi *et al.* (2018) afirman en su reseña, el efecto de la adición de la *MTGasa* en la estructura y textura del queso es controversial. Diversos estudios reportan un aumento significativo en la dureza debido al tratamiento enzimático en quesos tipo Cottage (Mazuknaite *et al.*, 2013; Cozzolino *et al.*, 2003), queso crema (Han *et al.*, 2003), Danbo UF (Mleko *et al.*, 2004), panela con formulación modificada (Salinas-Valdés *et al.*, 2015), mozzarella (Sarghini *et al.*, 2013), queso fresco probiótico (Radošević *et al.*, 2007), queso blanco iraní (Mahmood *et al.*, 2009), queso de suero de cabra (Karzan *et al.*, 2016), entre otros, con resultados de textura dependientes de la concentración de la enzima. Los resultados del presente trabajo estarían de acuerdo con estos estudios, ya que la dureza de los quesos tratados enzimáticamente es, para cualquier concentración de enzima, significativamente ($p < 0.05$) superior a la de los quesos Control (Figura 3.6). Sin embargo, dicho parámetro muestra diferencias significativas ($p < 0.05$)

en función de la concentración de enzima añadida, por lo que el máximo incremento en relación con el Control se obtuvo aplicando 0.4 g de MTG·L⁻¹. Más allá de esta concentración, la *MTGasa* parece tener un efecto perjudicial en la textura del queso. Este comportamiento sería acorde con el contenido de agua y proteínas, así como con la microestructura. Otros autores han evidenciado que la *MTGasa* puede tener efectos negativos sobre la textura, cuando se usa en concentraciones superiores a las óptimas (Asagami *et al.*, 1995; Imm *et al.*, 2000; Saguer *et al.*, 2007), probablemente debido a un entrecruzamiento excesivo que no permite la formación de una red de proteínas bien estructurada. Según O'Sullivan *et al.* (2002), el entrecruzamiento de las proteínas por acción de la *MTGasa* hace que las micelas de caseína sean extremadamente estables en presencia de fuerzas disruptivas, por lo que su aplicación sería recomendable en productos lácteos que puedan requerir una mayor estabilidad física.

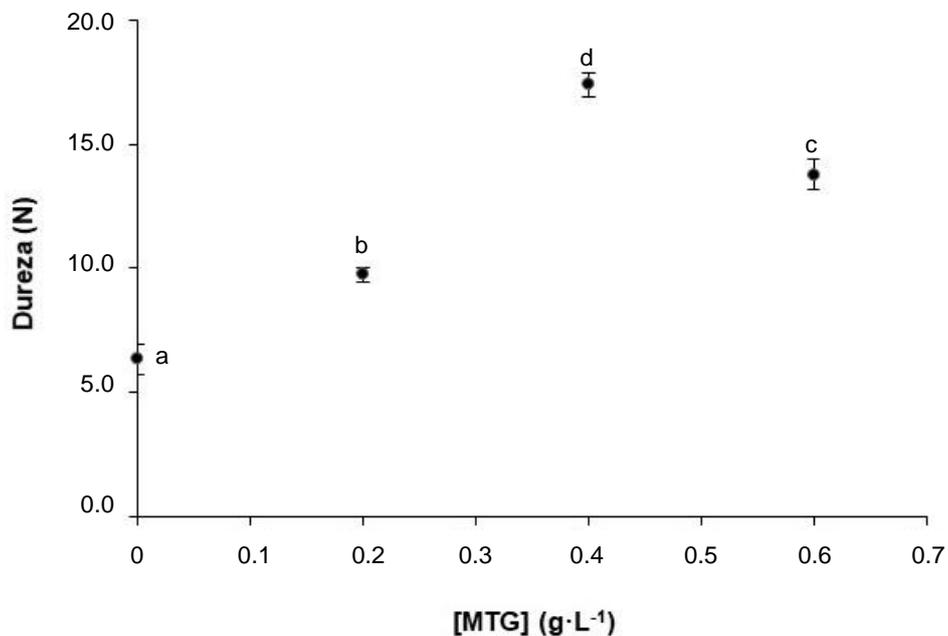


Figura 3.6. Dureza del queso como una función de la concentración de MTG. Medias \pm SD (n=3). Letras minúsculas diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre las medias, según el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

3.3 Conclusiones

El tratamiento con *MTGasa* durante el proceso de elaboración de queso fresco tipo quark, permitió incrementar el rendimiento quesero en un modo dependiente de la concentración de enzima añadida, dentro del rango ensayado (0.2, 0.4 y 0.6 g MTG·L⁻¹), estableciéndose una

relación lineal positiva entre ambos parámetros. Además, se observó que este incremento era debido tanto a un aumento de la cantidad de agua, como de sólidos lácteos retenidos. Sin embargo, el patrón de comportamiento en función de la concentración de enzima aplicada fue particular para cada uno de ellos. Mientras que la cantidad de agua retenida aumentó de manera proporcional a la concentración de *MTGasa*, en el caso de los sólidos lácteos el aumento en relación con el tratamiento sin enzima fue independiente de la concentración. Por otra parte, el tratamiento con *MTGasa* favoreció el proceso de desuerado en relación con las muestras Control, y redujo de manera significativa la cantidad de finos de caseínas recuperados durante esta etapa, lo que fue clave para la mejora del rendimiento quesero. El tratamiento con *MTGasa* incrementó también la dureza de los quesos obtenidos bajo cualquier concentración aplicada, aunque mostrándose una relación en forma de parábola invertida entre dichos parámetros. De hecho, el valor de dureza máximo se consiguió aplicando $0.4 \text{ g MTG}\cdot\text{L}^{-1}$; mientras que el tratamiento con una concentración superior pareció ir en detrimento de las mejoras obtenidas. Los efectos en la textura fueron coherentes con las micrografías SEM, las cuales mostraron una red más uniforme, con poros de menor tamaño y distribuidos de forma más homogénea, en los quesos tratados con *MTGasa* en la concentración que se mostró como óptima para la textura. Cambios en el perfil electroforético de las muestras tratadas respecto a las sin tratar, sugirieron que las modificaciones en las proteínas lácteas por entrecruzamientos catalizados por acción de *MTGasa*, podían estar relacionadas con los cambios observados.

Considerando la información expuesta a lo largo del presente capítulo, se puede afirmar que el tratamiento de leche semidesnatada con *MTGasa*, para la elaboración de quesos de coagulación ácida tipo quark, tuvo un impacto positivo tanto en el rendimiento, como en la textura y la composición química del producto, coherente con lo observado en los perfiles electroforéticos de las proteínas lácteas y en las micrografías SEM correspondientes a cada tratamiento. Además, el tratamiento con una concentración de *MTGasa* de $0.4 \text{ g MTG}\cdot\text{L}^{-1}$ puede considerarse el más adecuado para la optimización de las características del quark.

CAPÍTULO 4.

APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (*MTGasa*) EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS FRESCOS DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA

En quesos frescos de coagulación enzimática, se ha visto que el momento de aplicación de la *MTGasa* durante el proceso de elaboración del queso, suele afectar de manera significativa tanto el tiempo de coagulación, como las características del producto final (Cozzolino *et al.*, 2003; Di Pierro *et al.*, 2010; Fernandes de Sá y Bordignon-Luiz, 2010). Entre las propiedades que se han reportado como modificadas por acción de la *MTGasa* en estudios previos, se encuentran algunas tan relevantes para los consumidores, como la textura y determinadas características sensoriales, así como otras de mayor importancia para los productores, relacionadas con el rendimiento, la sinéresis, y los contenidos de agua y sólidos totales (Huppertz y de Kruif, 2007; Yuksel *et al.*, 2011; Özer *et al.*, 2013).

Si bien se pueden encontrar en la bibliografía trabajos aplicando la *MTGasa* previa, conjunta o posteriormente a la adición del agente coagulante, esta última opción -en la que la hidrólisis de la κ -CN, y por tanto la coagulación, tiene lugar antes de incorporar la *MTGasa*- es la que aparece más frecuentemente recomendada (Di Pierro *et al.* 2010; Fernandes De Sá y Bordignon-Luiz, 2010; Yuksel *et al.*, 2011). Sin embargo, experimentos realizados en el contexto de este estudio, en los que se determinó el efecto de la aplicación de *MTGasa* durante el corte de la cuajada en quesos de coagulación enzimática, en comparación con la ausencia de la enzima, no evidenciaron diferencias entre ellos en cuanto al rendimiento quesero.

Por el contrario, pruebas preliminares aplicando *MTGasa* en otros momentos del proceso de elaboración de queso, sugirieron un potencial de éxito mayor. Es por este motivo que el presente estudio se centró en determinar si, el tratamiento con *MTGasa* en una etapa de incubación previa a la adición del cuajo, o bien añadida juntamente con este, durante el proceso de elaboración de un tipo de queso fresco de coagulación enzimática, conllevaba mejoras en cuanto a rendimiento quesero y/o calidad del queso obtenido, en relación con el tratamiento sin adición de dicha enzima. Además, el efecto del momento de adición de la *MTGasa* se evaluó para 3 cuajos distintos (dos quimosinas producidas por fermentación, pero por empresas distintas, y un agente coagulante de origen fúngico) y partiendo siempre de leche cruda, que se

pasteurizó posteriormente. Los efectos se evaluaron tanto a nivel de las características del proceso, como de los quesos obtenidos. Además, para ajustar los parámetros de proceso de la elaboración de los quesos y profundizar en los efectos que supone la adición de *MTGasa*, fue necesario determinar previamente la cinética de coagulación de la cuajada para cada uno de los cuajos, y estudiar de qué manera la adición de la enzima afectaba dicha cinética.

4.1 Diseño Experimental

Todos los experimentos realizados en este estudio siguieron un diseño en bloques completos al azar, en el que los bloques se correspondían con los días de muestreo de la leche cruda, recogiendo muestra en 3 días distintos para cada experimento. Cada muestra de leche se dividió en 9 alícuotas para ensayar el efecto de la adición de *MTGasa* en dos momentos distintos durante la obtención de la cuajada (pre-incubación durante 30 min antes de la incorporación del cuajo, MTG/C; y adición conjunta con el cuajo, MTG+C), en comparación con el tratamiento sin adición de *MTGasa* (Control o Ct), empleando siempre la misma concentración de dicha enzima, y utilizando tres cuajos distintos (CHY-MAX, Maxiren y Fromase) para la elaboración del queso.

Inicialmente se determinó la cinética de coagulación para cada uno de los cuajos, bajo cualquiera de las condiciones anteriormente mencionadas en relación con la *MTGasa*, midiendo la firmeza de la cuajada durante un período de incubación de 1 h, con el fin de establecer el tiempo de cuajada y determinar cómo la *MTGasa* podía modificar la cinética.

Para el estudio del efecto de los factores relacionados con la aplicación de *MTGasa* y del tipo de cuajo utilizado sobre el proceso de elaboración de queso de coagulación enzimática, se aplicó el tiempo de coagulación obtenido en las cinéticas de coagulación para los respectivos tratamientos Control. En este estudio se llevó a cabo tanto la determinación del rendimiento quesero y la cuantificación de suero y fracción de finos, como el análisis de la composición química de sueros y quesos obtenidos; sobre estos últimos se realizaron análisis de textura, microestructura y perfil electroforético SDS-PAGE en condiciones reductoras.

4.2 Resultados y discusión

4.2.1 Cinética de coagulación de los cuajos

El interés en monitorear la coagulación de la leche radica en la necesidad del maestro quesero de reconocer el momento óptimo para iniciar el corte de la cuajada, una vez alcanzada la firmeza adecuada. Tradicionalmente, esto era determinado de forma subjetiva por el maestro quesero. En la práctica industrial actual, el corte se lleva a cabo de manera más común en un tiempo establecido después de la adición del cuajo (Lucey, 2009). El tiempo de corte puede variar entre 20 y 50 min, dependiendo de varios factores como la concentración del cuajo, la concentración de Ca^{2+} - γ , por tanto, la adición de CaCl_2 , la temperatura de coagulación, el pH y cambios estacionales en la composición de la leche, entre otros (Lucey *et al.*, 2011; Yüksel *et al.*, 2011).

Las cinéticas de coagulación obtenidas (Figura 4.1) señalan que para los tratamientos Control, independientemente del tipo de cuajo utilizado, se obtiene un producto mayormente cuajado después de un periodo aproximado de 30 - 35 min, desde la adición del agente coagulante; a partir de este momento, todas las cinéticas se van acercando de manera asintótica al valor de firmeza máxima. Los valores de firmeza obtenidos después de 30 min de incubación fueron 0.47 ± 0.01 N, 0.46 ± 0.01 N y 0.50 ± 0.01 N usando CHY-MAX, Maxiren y Fromase, respectivamente; mientras que la firmeza máxima se encontraba entre 0.60 y 0.70 N para todos los cuajos. Los resultados del ANOVA aplicado sobre los valores de firmeza a los 30 min, para los tratamientos Control, considerando como factores fijos el tipo de cuajo y el tiempo de coagulación, evidenciaron un efecto significativo ($p < 0.05$) de ambos factores, sin una interacción significativa entre ellos ($p > 0.05$). Como podía esperarse, la firmeza de las cuajadas era significativamente inferior a los 30 min de incubación, que a los 60 min y, en cualquiera de los dos tiempos de medida, los valores fueron significativamente ($p < 0.05$) inferiores en el caso de usar Fromase como agente coagulante, frente a CHY-MAX y Maxiren, los cuales se comportaban de manera idéntica. Esto parece lógico debido a que ambos productos contienen FPC como agente de coagulación, presentando la misma secuencia de aminoácidos de la molécula de la que fueron clonados, es decir, de la quimosina natural de *Bos taurus*. Como se mencionó anteriormente, a pesar de los cambios moleculares que el microorganismo productor de cada uno haya podido introducir o no en la secuencia, no se ha encontrado que dichas modificaciones hayan alterado las propiedades de la FPC, las cuales son casi idénticas a la quimosina de ternero (Andrén, 2011),

y por lo tanto se presenta de igual forma entre estos dos tipos de cuajo. En cuanto al Fromase, una proteasa aspártica ácida como la quimosina, pero de origen fúngico, presenta también la capacidad de hidrolizar el enlace Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶, pero causa además una extensa hidrólisis no específica tanto de κ -CN como de para- κ -CN (Crabbe, 2004), lo que podría repercutir en algunas propiedades del queso.

En la Figura 4.1 también es posible observar que cuando se adiciona la *MTGasa* en conjunto con el cuajo, prácticamente no hay cambios en la cinética de coagulación, mientras que la adición previa de la enzima polimerizadora ralentiza este proceso. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, según los cuales el tiempo de coagulación se alarga considerablemente cuando la leche es tratada con *MTGasa* previamente a la adición del cuajo (Lorenzen, 2000a; O'Sullivan *et al.*, 2002a; Domagala *et al.*, 2016). Incluso se ha observado que, si los tiempos de incubación con dicha enzima son excesivamente largos, se puede inhibir completamente la formación de la cuajada (Cozzolino *et al.*, 2003; Yüksel *et al.*, 2011). Esto podría deberse a que el tratamiento con *MTGasa* dificulta la liberación del caseinomacropéptido (CMP) de la κ -CN (Huppertz y de Kruif, 2007; Bönisch *et al.*, 2008), aunque hay cierta discrepancia en la literatura en relación con el mecanismo concreto de actuación durante la obtención de la cuajada. Por un lado, algunos autores indican que la inhibición de la coagulación por parte de la *MTGasa* se debe principalmente a la inhibición de la primera etapa del proceso de coagulación, y exponen como posible explicación que el entrecruzamiento por *MTGasa* dificulte la hidrólisis de la κ -CN y, de esta forma, la pérdida del CMP de las micelas, impidiendo o alargando la coagulación (O'Sullivan *et al.*, 2002). Por el otro, algunos autores han reportado que la prolongación en el tiempo de coagulación se debe a la inhibición de la fase secundaria, como resultado de la reducción en la tasa de agregación de micelas de para- κ -CNs, debido al incremento en el nivel de estabilización estérica (Huppertz y de Kruif, 2007). Otros autores plantean la posibilidad de que la *MTGasa* afecte tanto la fase primaria, como la secundaria, ya que el impacto de la reticulación de las proteínas en la fase enzimática de la coagulación podría estar relacionado con una inhibición de la liberación del CMP, debido al entrecruzamiento entre CMP y proteínas aún ligadas a la micela, lo que evitaría la pérdida del primero de la superficie micelar y, por tanto, impediría que se presente el requisito previo para la coagulación, que es la eliminación de las fuerzas de repulsión (Bönisch *et al.*, 2008; Özer *et al.*, 2012).

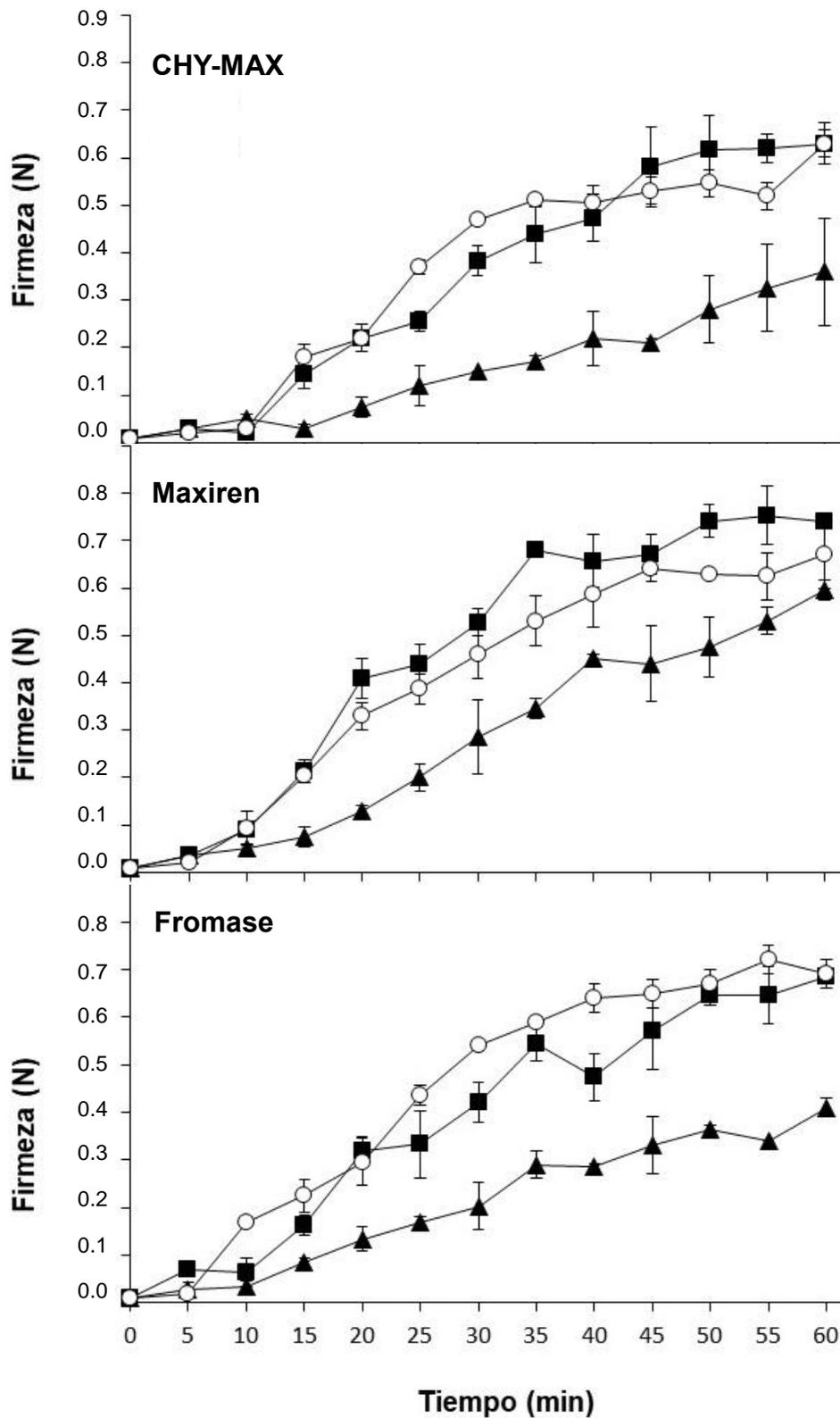


Figura 4.1. Cinéticas de coagulación obtenidas para los distintos cuajos en función del tratamiento aplicado: ○: Control, incubación solo con cuajo; ▲: MTG/C, pre-incubación con *MTGasa* seguida de incubación con cuajo; ■: MTG+C, incubación con *MTGasa* y cuajo simultáneamente. Medias \pm SD (n=3)

A partir de los datos obtenidos en esta parte del trabajo, se estableció un período de 30 min de incubación del cuajo antes del corte de la cuajada, para la elaboración de los quesos de coagulación enzimática, tanto para los tratamientos Control, como para aquellos que incluían la adición de *MTGasa*, sin tener en consideración su momento de adición durante el proceso de elaboración del queso y el efecto que ello conlleva sobre la cinética de coagulación.

4.2.2 Rendimiento quesero

Los resultados obtenidos en el rendimiento de los quesos de coagulación enzimática están en sintonía con los reportados en la literatura, en cuanto a que el tratamiento con *MTGasa* durante la producción de queso permite mejorar el rendimiento del producto final (Fernandes de Sá y Bordignon-Luiz, 2010; Özer *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2014; Domagala *et al.*, 2016). El análisis estadístico de los resultados de rendimiento de los quesos, considerando tipo de cuajo y tratamiento con/sin *MTGasa* como factores fijos, no mostró una interacción significativa ($p > 0.05$) entre ambos, ni tampoco un efecto significativo ($p > 0.05$) del cuajo empleado. Por el contrario, se observó que, para cada uno de estos, los rendimientos de los quesos tratados con *MTGasa* eran significativamente superiores ($p < 0.05$) al rendimiento de los quesos Control (Figura 4.2). Además, no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los dos tratamientos con *MTGasa*, es decir, que la aplicación de esta enzima en una etapa u otra del proceso no influye en el rendimiento del producto final.

El rango de valores de rendimiento obtenido para los distintos tratamientos aplicados en relación con la enzima *MTGasa*, y considerando conjuntamente los resultados de los tres agentes coagulantes, fue de 17.1% a 20.5% para el tratamiento Control, de 19.2% a 22.6% para el tratamiento MTG/C, y de 18.5% a 20.9% para el tratamiento MTG+C. Como se puede deducir de la Figura 4.2, tanto para el tratamiento Control como para el tratamiento MTG+C, los 3 coagulantes se comportaron de una manera muy similar; sin embargo, en el caso del tratamiento MTG/C, aunque con los cuajos CHY-MAX y Fromase se obtuvieron valores medios de rendimiento mayores que en el caso de Maxiren, la variabilidad entre repeticiones también fue más elevada, indicando ser más susceptibles a cambios, ya sea en la materia prima o de proceso.

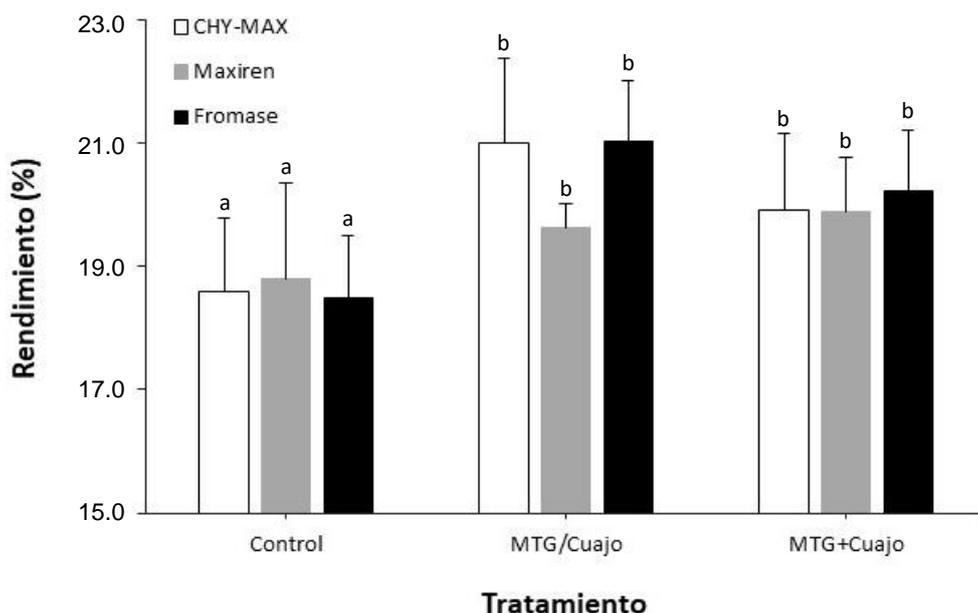


Figura 4.2. Porcentaje de rendimiento de quesos de coagulación enzimática, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Control, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (CHY-MAX, Maxiren, Fromase). Medias \pm SD (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos relacionados con la *MTGasa*, según el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

Otros autores también han estudiado los efectos de la adición de la *MTGasa* en la leche para la producción de queso, a través de geles de proteínas lácteas o preparaciones similares. Bönisch *et al.* (2008) concluyeron que el incremento en el rendimiento puede atribuirse a una mejora en la capacidad de retención del suero, debido a que los geles presentan propiedades físicas alteradas por la adición de la *MTGasa*. Similar a lo comentado por Özer *et al.* (2012), el tratamiento térmico de la leche a 75 °C durante 20 s, que se llevó a cabo para la elaboración de los quesos de coagulación enzimática, no se espera que cause una desnaturalización significativa de las proteínas séricas; por lo tanto, se podría asumir que la diferencia en los rendimientos de los quesos tratados, en comparación con el Control, se debe principalmente a la acción de la *MTGasa*. Ambos autores reportaron que el tratamiento más efectivo en el incremento del rendimiento de los geles fue el de la adición simultánea de *MTGasa*, debido a que los nuevos enlaces covalentes formados por acción de la *MTGasa* estabilizan la red del gel, incrementando la capacidad de retención de agua del queso. Sin embargo, otros autores mantienen que el aumento en el rendimiento no es solo debido a la mayor retención de la fracción de suero en el queso, sino también a un ligero incremento en el porcentaje de proteínas (Özer *et al.*, 2013).

Escobar *et al.* (2014) y Di Pierro *et al.* (2010), también reportaron resultados respecto al incremento del rendimiento mediante la adición simultánea de ambas enzimas, aunque en dichos estudios no se evaluó la incubación previa de la leche con *MTGasa*, sino que se comparó con la adición de la *MTGasa* incorporada después del corte de la cuajada. Escobar *et al.* (2014) obtuvieron un aumento de entre el 4% y el 6% de rendimiento en la producción de queso Dambo, en relación con el Control, cuando se adicionaban ambas enzimas al mismo tiempo. Asimismo, Di Pierro *et al.* (2010) reportaron que la incorporación conjunta de cuajo y *MTGasa* produjo un aumento en el rendimiento y en el contenido de agua del queso tratado, pero obteniendo un contenido total de proteína superior cuando se adicionaba la *MTGasa* después del corte de la cuajada. Por su parte, Domagala y su equipo (2016) llevaron a cabo un estudio de las propiedades de geles de proteína láctea, elaborados bajo diferentes condiciones de incubación de la *MTGasa*, previas a la adición del cuajo y en adición simultánea con este, llegando a la conclusión de que es posible obtener un queso de coagulación enzimática con propiedades nutricionales y de textura modificadas, así como rendimiento mejorado, mediante la acción de la *MTGasa*, pero recomendando la adición simultánea de cuajo y *MTGasa* en el proceso de producción.

A la hora de escoger lo que puede reportar cada tratamiento para la industria productora de quesos, se deben tener en cuenta no solo los resultados de rendimiento, sino también los costos asociados a los cambios que pueda implicar a nivel del proceso de producción. Por un lado, se podría considerar que, en nuestro estudio, los mayores rendimientos se pueden alcanzar con el tratamiento MTG/C, es decir, llevando a cabo una pre-incubación de 30 min de la *MTGasa*, antes de la incorporación del cuajo, lo que implica un proceso de 60 min, teniendo en cuenta el tiempo de coagulación establecido para el proceso de producción del tipo de queso evaluado. Sin embargo, la variabilidad obtenida no permite diferenciarlos, desde un punto de vista estadístico, de aquellos rendimientos obtenidos con el tratamiento MTG+C, el cual requiere solo un periodo de 30 min de incubación con enzimas. Por lo tanto, en las condiciones de proceso aplicadas en el presente estudio, resulta más provechoso el incremento en el rendimiento obtenido con el tratamiento MTG+C, debido al ahorro en tiempo de proceso que se consigue. En la producción del queso Dambo uruguayo también se consideró, a efectos prácticos, que el tratamiento de adición de la *MTGasa* conjuntamente con el cuajo, era el más fácil de implementar en las condiciones de la industria y de acuerdo a la infraestructura que se maneja en las queserías de este tipo, ya que simplemente se requería incorporar un ingrediente más al proceso, sin

necesidad de modificar las condiciones de fabricación, nuevo equipamiento o entrenamiento del personal (Escobar *et al.*, 2014), aunque para tomar una decisión se hace necesario evaluar otros parámetros del proceso y las propiedades del producto final. Sin embargo, podría ser interesante mejorar las condiciones de proceso en el tratamiento MTG/C, para obtener rendimientos elevados de manera más reproducible.

En cuanto a la fracción de finos, el análisis estadístico de los datos mostró que no había un efecto significativo ($p>0.05$) del tipo de cuajo empleado, sobre el porcentaje de finos obtenido, calculado en relación con el peso inicial de leche. Por el contrario, sí se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$) entre tratamientos con y sin adición de *MTGasa*, durante el proceso de elaboración de queso. La no significación ($p>0.05$) de la interacción entre ambos factores indica que el comportamiento en función de los distintos tratamientos es independiente del tipo de cuajo utilizado.

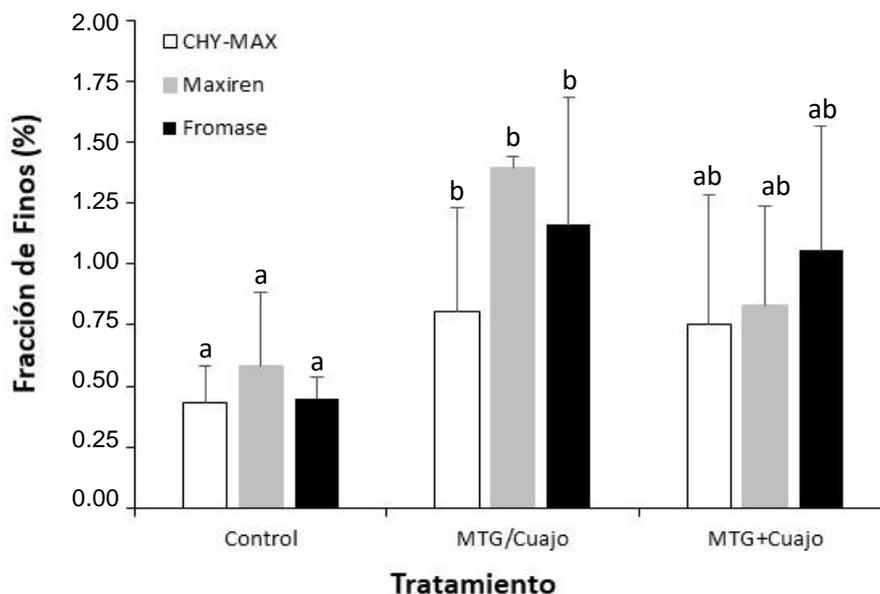


Figura 4.3. Porcentaje de la fracción de finos de los quesos de coagulación enzimática en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Control, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (CHY-MAX, Maxiren, Fromase). Medias \pm SD (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en relación con la aplicación o no de *MTGasa*, según el test de separación de medias de Tukey ($p<0.05$)

Tal y como puede observarse en la Figura 4.3, en los tratamientos Control (sin *MTGasa*), el porcentaje de finos obtenido era significativamente menor ($p<0.05$) que en el caso de los quesos

elaborados añadiendo el agente coagulante 30 min después de la adición de la *MTGasa* (MTG/C). Mientras que, cuando se aplicaban simultáneamente ambas enzimas, el porcentaje de finos no se mostraba significativamente ($p>0.05$) diferente de ninguno de los otros dos tratamientos. Sin embargo, a pesar de las diferencias establecidas entre los tratamientos con y sin *MTGasa* a partir del análisis estadístico, cabe señalar que los valores obtenidos pueden considerarse bajos para todos los tratamientos. El rango de valores obtenidos para los tratamientos Control, MTG/C y MTG+C fueron 0.28%-0.92%, 0.51%-3.08% y 0.41-1.62%, respectivamente, lo que denota mermas poco relevantes del proceso, en comparación con otros beneficios, como el incremento en el rendimiento que registraron los quesos tratados con *MTGasa*.

Se ha indicado que la firmeza del gel al momento del corte de la cuajada es importante para la textura final del queso, pero también para maximizar la transferencia de caseínas y grasa a la cuajada. De esta forma, el corte de cuajada llevado a cabo tanto por debajo como por encima de un nivel crítico puede llevar a la pérdida de finos de caseína en el suero y, por consiguiente, a una disminución en el rendimiento del queso (Riddell-Lawrence y Hicks, 1989; Johnson *et al.*, 2001; Walstra *et al.*, 2006). De acuerdo con lo anterior y teniendo en cuenta los datos de porcentaje de finos obtenidos en el presente estudio, se podría considerar que el momento de corte establecido fue adecuado, ya que los quesos Control presentaron una pérdida mínima de finos; y que posiblemente los tratamientos con *MTGasa* pudieron haber requerido un tiempo mínimo adicional, para asegurar una pérdida menor de finos.

4.2.3 Composición química de suero y queso

En la Tabla 4.1 se muestra el contenido de agua, proteína, cenizas y calcio de los sueros obtenidos durante el proceso de elaboración de quesos frescos de coagulación enzimática, en función del tipo de agente coagulante y de la adición o no de la enzima *MTGasa*. Tal y como era de esperar, el contenido de agua era muy elevado en todas las muestras de suero analizadas, obteniéndose siempre valores entre el 91% y el 95%. Los resultados del ANOVA aplicado sobre estos datos indicaron que el porcentaje de agua no dependía significativamente ($p>0.05$) ni del tipo de cuajo añadido para la obtención de la cuajada, ni del tratamiento relacionado con la *MTGasa*. Tampoco se observó un efecto significativo de dichos factores sobre el contenido de

calcio del suero; los valores se encontraron dentro de un rango de 17.32 - 21.86 mg·100 g⁻¹ de suero.

Tabla 4.1. Composición química de los sueros obtenidos durante el proceso de elaboración de quesos frescos de coagulación enzimática en función del agente coagulante utilizado y del tratamiento o no con *MTGasa*. Medias ± SD (n=3). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los distintos cuajos utilizados, según el test de separación de medias de Tukey ($p<0.05$)

Agente Coagulante	Tratamiento	H ₂ O (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Calcio (mg·100 g ⁻¹)
CHY-MAX	Control	93.80 ± 1.23	0.94 ± 0.04 B	0.50 ± 0.08 B	20.3 ± 5.8
	MTG/C	93.12 ± 1.27	0.92 ± 0.02 B	0.48 ± 0.14 B	17.7 ± 6.5
	MTG+C	92.63 ± 0.96	0.94 ± 0.06 B	0.54 ± 0.16 B	17.3 ± 5.6
Maxiren	Control	92.58 ± 0.40	0.89 ± 0.01 AB	0.46 ± 0.06 B	17.9 ± 1.6
	MTG/C	92.62 ± 1.28	0.90 ± 0.04 AB	0.47 ± 0.04 B	19.3 ± 4.0
	MTG+C	92.88 ± 1.28	0.90 ± 0.04 AB	0.49 ± 0.09 B	19.2 ± 3.8
Fromase	Control	93.51 ± 2.03	0.87 ± 0.02 A	0.41 ± 0.07 A	18.4 ± 3.6
	MTG/C	92.59 ± 1.22	0.88 ± 0.01 A	0.39 ± 0.07 A	21.3 ± 3.2
	MTG+C	92.64 ± 0.27	0.88 ± 0.02 A	0.41 ± 0.05 A	21.9 ± 5.7

Por el contrario, sí se presentaron diferencias significativas ($p<0.05$) por efecto del cuajo, tanto en el contenido de proteínas, como de cenizas, aunque para los dos parámetros se obtuvieron valores relativamente bajos, en concordancia con los elevados valores de contenido de agua. En este sentido, se reportaron valores significativamente inferiores ($p<0.05$) de contenido de proteína cuando se empleó el coagulante de origen fúngico (Fromase) en relación con los obtenidos utilizando CHY-MAX, mientras que con Maxiren, los resultados obtenidos no se diferenciaban significativamente ($p>0.05$) de ninguno de los dos anteriores. A esta misma conclusión se llegó expresando las pérdidas de proteína a través del suero, en porcentaje respecto al peso inicial de leche, y teniendo en cuenta la fracción de suero. Las pérdidas computadas para cada uno de los cuajos, considerando todos los datos independientemente del tratamiento o no con *MTGasa*, fueron 0.69±0.02%, 0.71±0.02% y 0.72±0.04% para Fromase, Maxiren y CHY-MAX, respectivamente. Estos resultados contrastan con la bibliografía consultada, donde se ha reportado que una baja especificidad por parte del agente coagulante empleado en la producción del queso puede resultar en una mayor pérdida de péptidos en el

suero, debido a la escisión de otros enlaces peptídicos diferentes al Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶ de la κ-CN, lo que podría acompañarse de una reducción en el rendimiento de entre 0.3% - 0.7% y un contenido superior de proteína en el suero (Emmons, 1990; Emmons *et al.*, 1990; Emmons y Binns, 1990; Jacob *et al.*, 2011).

En relación con el contenido de cenizas, los resultados del análisis estadístico fueron muy similares a los del contenido en proteína, aunque en este caso, utilizando las dos quimosinas obtenidas por fermentación se obtuvieron valores significativamente ($p < 0.05$) superiores a los del agente de origen fúngico. De cualquier modo y a pesar de las diferencias estadísticas reportadas, en la práctica, los cambios en los contenidos de proteínas y de cenizas entre sueros procedentes de elaboraciones utilizando los diferentes agentes coagulantes, fueron mínimos y no denotan gran importancia para el análisis del presente estudio.

Tabla 4.2. Composición química de los quesos frescos de coagulación enzimática, en función del agente coagulante utilizado y del tratamiento o no con *MTGasa*. Medias \pm SD (n=3). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre cuajos, mientras que letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en relación con la aplicación o no de *MTGasa*, según el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

Agente Coagulante	TRATAMIENTO	H ₂ O (%)	Proteína (%)	Cenizas (%)	Calcio (mg·100 g ⁻¹)
CHY-MAX	Control	60.34 \pm 2.37	12.45 \pm 1.57	1.81 \pm 0.05	265.9 \pm 29.1 B
	MTG/C	64.07 \pm 1.07	13.59 \pm 1.55	1.72 \pm 0.06	266.9 \pm 38.6 B
	MTG+C	61.24 \pm 0.96	13.93 \pm 0.88	1.70 \pm 0.08	272.4 \pm 42.2 B
Maxiren	Control	59.29 \pm 0.15	14.36 \pm 1.15	1.77 \pm 0.05	269.3 \pm 51.3 AB
	MTG/C	63.22 \pm 2.47	13.63 \pm 0.61	1.68 \pm 0.11	211.8 \pm 41.6 AB
	MTG+C	61.53 \pm 0.95	13.99 \pm 0.46	1.74 \pm 0.07	248.1 \pm 9.0 AB
Fromase	Control	58.04 \pm 0.89 a	14.34 \pm 0.73	1.74 \pm 0.07	230.5 \pm 64.0 A
	MTG/C	65.54 \pm 0.33 c	13.80 \pm 1.07	1.69 \pm 0.07	219.8 \pm 18.1 A
	MTG+C	64.06 \pm 0.79 b	14.01 \pm 1.05	1.69 \pm 0.02	260.3 \pm 37.8 A

La Tabla 4.2 detalla los porcentajes obtenidos para los contenidos de agua, proteínas, cenizas y calcio de los quesos Control y tratados con *MTGasa*, elaborados con los tres tipos de coagulante diferentes. De acuerdo con el análisis estadístico aplicado a los datos de composición, no se

encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) ni por efecto del agente coagulante, ni del tratamiento aplicado en relación con la *MTGasa*, en lo que respecta al contenido de proteína y de cenizas de las diferentes muestras de queso. Por el contrario, el ANOVA realizado para el contenido de agua evidenció una interacción significativa ($p<0.05$) entre el tipo de coagulante empleado y el tratamiento en relación con la *MTGasa*, por lo que el efecto de este último se analizó para cada uno de los agentes coagulantes por separado. Para CHY-MAX y Maxiren, no se obtuvieron diferencias significativas ($p>0.05$) en el contenido de agua de los quesos, en función del tratamiento con/sin *MTGasa*, mientras que sí resultó significativo ($p<0.05$) en el caso de Fromase. De acuerdo con los resultados del test de separación de medias de Tukey, para este tipo de coagulante se obtuvo que todos los tratamientos eran significativamente ($p<0.05$) diferentes entre ellos por lo que respecta al contenido de agua, siendo el tratamiento MTG/C el de mayor porcentaje, aunque no muy superior al de los quesos sometidos al tratamiento MTG+C. En los quesos Control, el contenido de agua era un 6-7% menor que en los tratamientos con *MTGasa*. Globalmente, estos resultados de humedad se encuentran en sintonía con los resultados obtenidos para el rendimiento de los quesos, es decir, los resultados evidencian un cierto paralelismo entre rendimiento quesero y contenido de agua de los quesos.

Resultados similares a los obtenidos para el tratamiento MTG+C fueron reportados por Cozzolino *et al.* (2003) y Di Pierro *et al.* (2010), cuando estudiaron la adición simultánea de *MTGasa* y cuajo -quimosina en ambos casos- en la producción de queso, en donde el porcentaje de proteína no se veía afectado, mientras que el contenido de agua del queso se incrementaba. Según estos últimos autores, el incremento en el contenido de agua del queso se debe al cambio en la estructura de las micelas de caseína antes y después de la reacción de coagulación. En efecto, la humedad del queso depende de la sinéresis que se produce durante el proceso de producción de la cuajada, que a su vez se ve afectada tanto por su encogimiento, como por la reorganización de la red de micelas de para- κ -CN del gel (Walstra, 1993). De acuerdo con sus conclusiones, cuando se añaden conjuntamente ambas enzimas, el cuajo tiene tiempo suficiente para hidrolizar la κ -CN y producir micelas de para- κ -CN, con su consecuente floculación. La reacción del cuajo sobre la κ -CN antes de la agregación, altera la conformación de la micela de caseína liberando α_s -CN, que es igualmente susceptible de convertirse en sustrato de la *MTGasa*, siendo covalentemente retenida en la cuajada; con lo cual concluyen que los enlaces covalentes catalizados por la *MTGasa* estabilizan las micelas de para- κ -CN, disminuyendo el encogimiento de la cuajada, y por consiguiente aumentando la cantidad de suero (agua) retenido en la misma.

En la cuantificación de calcio de los quesos, los resultados indicaron que no había una interacción significativa ($p>0.05$) entre tratamiento con/sin *MTGasa* y el tipo de agente coagulante empleado, ni un efecto significativo ($p>0.05$) del primero, en contraste con el tipo de coagulante. De esta forma, el mayor contenido de calcio se encontró en los quesos elaborados con CHY-MAX, dentro de un rango de 265.91 - 272.45 mg·100 g⁻¹; mientras que el menor se obtuvo en los quesos con Fromase, con valores de 219.82 - 260.25 mg·100 g⁻¹. Los quesos en los cuales se aplicó el Maxiren, tuvieron un contenido intermedio entre 211.85 - 269.29 mg·100 g⁻¹.

4.2.4 Textura del queso

La evaluación de la textura final de las diferentes muestras de queso refleja una disminución significativa ($p<0.05$) en la dureza de los quesos tratados con *MTGasa*, en comparación con el tratamiento Control. Asimismo, se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos enzimáticos aplicados en relación con la *MTGasa*, MTG/C y MTG+C. Como se aprecia en la Figura 4.4, las muestras Control de cada cuajo registraron los mayores valores de dureza entre los quesos, seguidos de forma descendente por los quesos con el tratamiento conjunto de *MTGasa* y cuajo (MTG+C). Estos presentaron valores intermedios entre los controles y las muestras tratadas con incubación previa de la enzima polimerizadora (MTG/C), las cuales reportaron las texturas más bajas entre los tratamientos. En cuanto a los tipos de cuajo, el análisis estadístico indicó que este factor no tenía una influencia significativa ($p>0.05$) sobre la dureza del queso en las condiciones ensayadas en el presente estudio.

Otros estudios han demostrado que el tratamiento con *MTGasa* –aunque en condiciones ligeramente distintas a las aplicadas en el presente estudio- puede afectar el proceso de coagulación de la leche, inhibiendo la liberación del CMP de las micelas de caseína, debido al entrecruzamiento de las proteínas por acción de la *MTGasa* (O'Sullivan *et al.*, 2002; Bönisch *et al.*, 2008; Özer *et al.*, 2012), resultando en un mayor rendimiento del queso pero en una disminución de la textura (Özer *et al.*, 2013), de forma similar a los resultados que se han obtenido en el presente estudio.

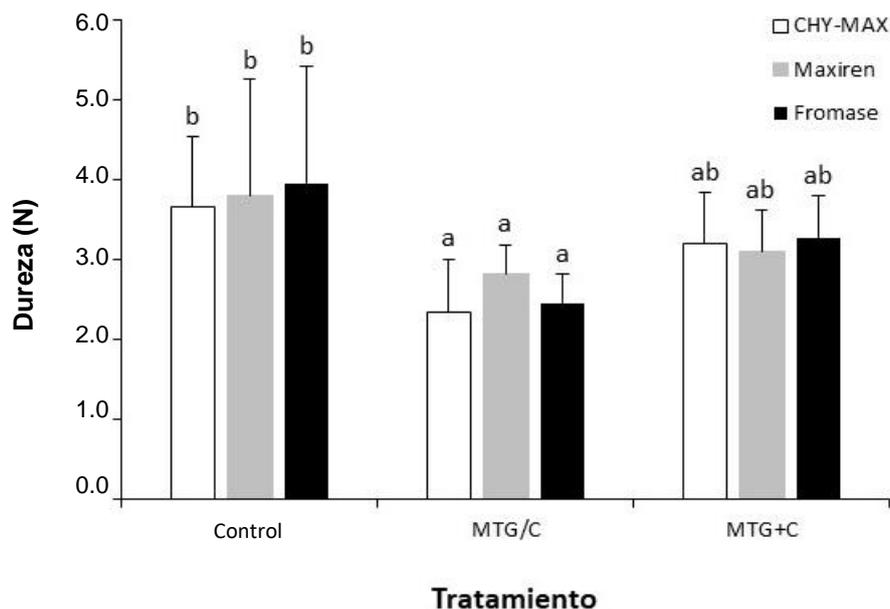


Figura 4.4. Dureza de los quesos en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Control, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (CHY-MAX, Maxiren, Fromase). Medias \pm SD (n=3). Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en relación con la aplicación o no de *MTGasa*, según el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

Yüksel *et al.* (2011) investigaron el efecto de la adición de *MTGasa* en diferentes momentos de aplicación -previamente, simultáneamente y después de la adición del cuajo- analizando detalladamente la hidrólisis del CMP durante la coagulación. La adición de la *MTGasa* previa al cuajo se hizo con un tiempo de incubación de 90 min, impidiendo completamente la separación del CMP y la formación del gel, como resultado de la creación de nuevos enlaces covalentes entre las moléculas de κ -CN, ante lo cual se concluyó que posiblemente al cuajo le fue imposible acceder al enlace Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶, debido a la reorganización de la estructura de micelas de caseínas, por el entrecruzamiento intramolecular de las κ -CNs catalizado por la *MTGasa*. Considerando los resultados de textura expuestos anteriormente para el presente estudio, se podría afirmar que en el caso del tratamiento MTG/C, en el que la textura de los quesos se vio reducida, pudo haberse producido cierto grado de entrecruzamiento de las moléculas de κ -CN, provocando la disminución en el nivel de CMP liberado en el suero y, por tanto, la acción del cuajo se dio en menor medida. De esta manera el gel formado presentó una dureza menor, derivando en una textura inferior del producto final. Sin embargo, debido a que el tiempo de incubación de la leche con *MTGasa* fue menor al reportado por Yüksel *et al.* (2011), el grado de

entrecruzamiento de las κ -CNs pudo haber sido menor, posibilitando la coagulación de la leche tratada.

Mientras que, de manera semejante a lo ocurrido en el tratamiento MTG+C, donde se adicionaron conjuntamente ambas enzimas, los resultados de Yüksel *et al.* (2011) indicaron que cierta cantidad de moléculas de κ -CN había sido hidrolizada por el cuajo, al tiempo que en la parte restante se creaban enlaces intramoleculares por acción de la *MTGasa*. El hecho de que se haya presentado una hidrólisis de κ -CN lo suficientemente alta, pudo haber incrementado la hidrofobicidad por la presencia de para- κ -CN, causando la agregación de las proteínas y la formación de la red tridimensional. Se concluyó además, que el hecho de que la dureza del gel aumentara con el avance de la coagulación, demostró que igualmente la presencia de la *MTGasa* pudo haber causado el entrecruzamiento intermolecular entre micelas con para- κ -CN y/o las micelas floculadas, estabilizando la estructura micelar mediante los nuevos enlaces covalentes, y mejorando las propiedades de textura del gel. En consecuencia y volviendo al análisis de los resultados del presente estudio, los quesos tratados con *MTGasa* mediante el tratamiento MTG+C, presentaron una textura superior a los del tratamiento MTG/C, pero inferior a la de los quesos Control, en los que no hubo interferencia del proceso de coagulación al no haberse aplicado ningún tratamiento con *MTGasa*. Domagala *et al.* (2016) obtuvieron resultados similares, en cuanto a que la adición simultánea de *MTGasa* y cuajo dio como resultado una dureza superior, en comparación con los quesos tratados con la enzima antes de la incorporación del cuajo, concluyendo por su parte que el momento de adición de la *MTGasa* tuvo un papel decisivo sobre las propiedades de textura de los quesos.

Debido a que la textura es un parámetro fundamental en la aceptabilidad del producto final por parte del consumidor, se llevó a cabo un análisis de textura de tres quesos comerciales frescos de coagulación enzimática (elaborados con leche de vaca, de manera tradicional). Este se realizó como marco de referencia del presente estudio, con el fin de conocer en qué rango de textura se encuentran los quesos comerciales que se consumen de forma regular en el mercado local, para tener una idea del nivel de aceptación que tendrían los quesos experimentales en cuanto a la textura. Las medidas de textura de los quesos comerciales se realizaron siguiendo el mismo protocolo descrito para las muestras experimentales. Los resultados obtenidos indican que los quesos comerciales se encuentran dentro de un rango de textura de 2.23 N - 2.95 N. Curiosamente, las texturas que más se acercan a estos valores son las de los quesos

experimentales preparados con el tratamiento MTG/C, es decir, los que presentan las texturas más bajas del estudio, en un rango de 2.34 N - 2.83 N. Los valores de dureza de los quesos Control y MTG+C se encuentran por encima de 3.0 N y su textura, en comparación con los quesos comerciales, podría considerarse más dura de lo habitual.

Otros autores han reportado resultados similares en cuanto al efecto de *la MTGasa* en cambios en la microestructura, acompañados de una reducción en la textura del queso. Se ha informado, por ejemplo, de una disminución en la textura del queso blanco en salmuera bajo en grasa, con un aumento en la porosidad, debido al entrecruzamiento de proteínas del suero por acción de *la MTGasa* (Sayadi *et al.*, 2012 y 2013). Gharibzahedi *et al.* (2018) indican en su reseña bibliográfica, que la disminución en la dureza del queso puede estar relacionada con un incremento en las moléculas de agua retenidas en la red proteica, proporcionando una mayor flexibilidad a la estructura a través del rol lubricante-plastificante del agua (Sayadi *et al.*, 2013).

4.2.5 Perfil proteico

En los perfiles electroforéticos de las fracciones caseínicas de los quesos de coagulación enzimática, que se aprecian en la Figura 4.5, se puede observar claramente en la parte superior del gel, la aparición de nuevas bandas alrededor de los indicadores de peso de 50 kDa y 250 kDa, que no se encuentran en las muestras Control y que podrían tratarse de dímeros, trímeros o polímeros formados entre proteínas séricas y/o caseínas debido a la presencia de *la MTGasa*. Algunas de estas nuevas formaciones proteicas alcanzan a ingresar al gel apilador, e incluso atravesarlo. Asimismo, es posible observar unas bandas oscuras correspondientes a polímeros mucho más complejos en el límite superior del gel en todos los tratamientos con *MTGasa*, incapaces de atravesarlo, confirmando igualmente la polimerización de las proteínas lácteas y la formación de polímeros de alto peso molecular, por el tratamiento enzimático con *MTGasa*, ya que estas bandas no son visibles en los perfiles de los quesos Control (Ct).

Para las bandas correspondientes a α_s - y β -CNs, es posible ver una disminución de su tamaño en las muestras tratadas con *MTGasa*, en comparación con los controles. Sin embargo, en el caso

de los quesos de coagulación enzimática, la hidrólisis de la κ -CN por efecto del cuajo hace que dicha proteína no aparezca ni siquiera en los perfiles correspondientes a las muestras Control.

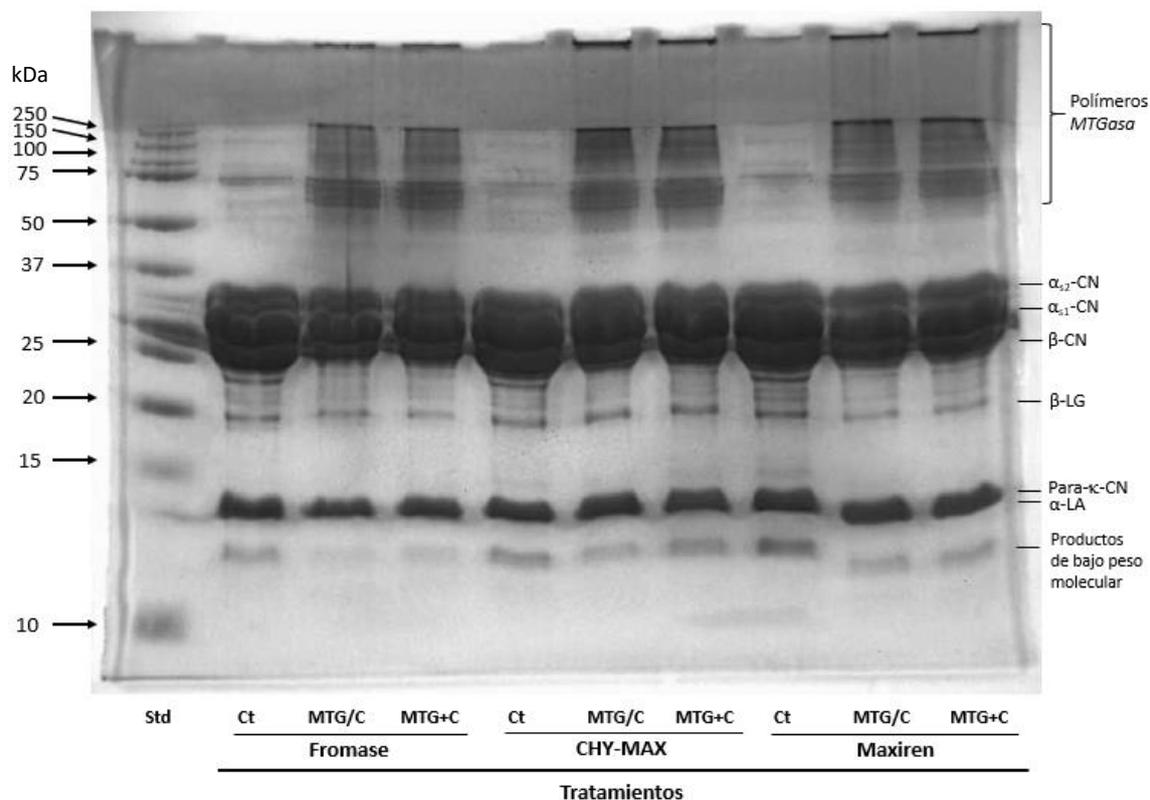


Figura 4.5. Perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras de las fracciones caseínicas de los quesos de coagulación enzimática, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG) en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C) y del agente coagulante empleado (Fromase, CHY-MAX, Maxiren)

En la parte inferior del gel, se observa una banda más difusa, correspondiente a productos de bajo peso molecular, notando un ligero incremento de su intensidad en los controles de los tres cuajos, en comparación con las muestras tratadas enzimáticamente, lo cual podría estar relacionado con la incorporación de dichos residuos proteicos en los nuevos polímeros formados, y que habrían sido incorporados en el queso por el entrecruzamiento catalizado por la *MTGasa*. Muy cerca a esta banda, y por debajo del estándar de peso de 15 kDa, se observa una banda gruesa, en la cual se encuentran muy próximas la para- κ -CN -con un peso molecular cercano a los 13 kDa- (Azuma *et al.*, 1984) y la α -lactoalbúmina (Ong *et al.*, 2006). La presencia de la para- κ -CN sería un indicador de que el proceso de coagulación y la acción del cuajo como tal en la hidrólisis de la κ -CN, no se vio afectado por la acción de la *MTGasa* sobre las micelas de

caseína, y de manera especial sobre la κ -CN. La similitud en las bandas de este tipo en muestras tratadas con *MTGasa* indicaría que los tiempos de adición de la enzima evaluados en este estudio, no fueron determinantes en la acción de la enzima sobre estas proteínas lácteas. En cuanto al tipo de coagulante, se aprecia un comportamiento diferencial entre los FPC y el cuajo de origen fúngico.

4.2.6 Microestructura del queso

Las micrografías obtenidas mediante SEM, de los quesos elaborados con y sin *MTGasa* para los cuajos CHY-MAX, Maxiren y Fromase, se presentan en las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8, respectivamente. En ellas se puede observar como la microestructura de los quesos se vio afectada tanto por el tipo de cuajo empleado en cada caso, como por la presencia de la *MTGasa*, con cambios evidentes incluso entre los dos tratamientos distintos con dicha enzima. En consecuencia, se podría afirmar que la homogeneidad y el tamaño de los poros dependen tanto de la adición de la *MTGasa*, como del tipo de coagulante que se aplique. En este sentido, Schorsch *et al.* (2000) señalan que, con la introducción de enlaces covalentes en sistemas de proteína láctea, se puede esperar la obtención de geles con una estructura diferente a la de los geles tradicionales, ya que se considera que la estabilidad de los tradicionales está dada principalmente por interacciones débiles no covalentes.

En relación con el efecto de los cuajos sobre la microestructura, se hace evidente que cada uno provoca un tipo de estructura diferenciada por la forma y distribución de los poros, así como por el arreglo de los agregados de proteína en general. Esto puede resultar sorprendente en el caso de CHY-MAX y Maxiren dado que en ambos casos se trata de la misma enzima; sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad de las enzimas puede verse fácilmente modificada, aún por pequeños cambios.

En cuanto a la *MTGasa*, las micrografías de los quesos Control presentan una estructura heterogénea, con poros de tamaño variable, en comparación con los quesos tratados con la enzima. En las imágenes del tratamiento MTG/C, la microestructura se presenta mucho más organizada y uniforme, con poros más definidos y en mayor cantidad. Mientras que en el tratamiento MTG+C se reduce en cierto grado la uniformidad en la distribución de los poros y

se obtiene una estructura con características intermedias entre las obtenidas para los tratamientos Control y MTG/C. La microestructura de los quesos Control se observa más compacta, en contraste con la de los tratamientos con *MTGasa* que presentan un cambio en el patrón de porosidad lo que permitiría retener una mayor cantidad de agua, coincidiendo con los resultados de los análisis de composición. De esta forma, los cambios en la microestructura estarían también en sincronía con los resultados de rendimiento obtenidos para los quesos tratados con *MTGasa*, y con los valores de textura reportados para los mismos quesos. En este sentido, un mayor rendimiento estaría inversamente relacionado con la dureza de los quesos. Resultados similares han sido reportados por otros autores (Kuraishi *et al.*, 1997; Di Pierro *et al.*, 2010).

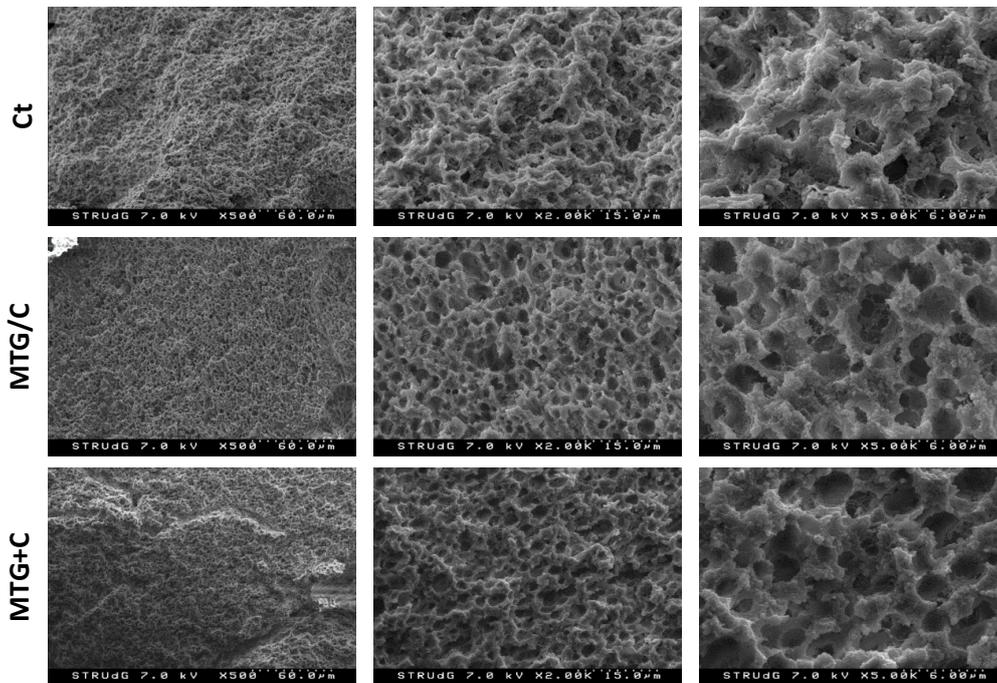


Figura 4.6. Micrografías SEM de los quesos de coagulación enzimática elaborados con CHY-MAX, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C)

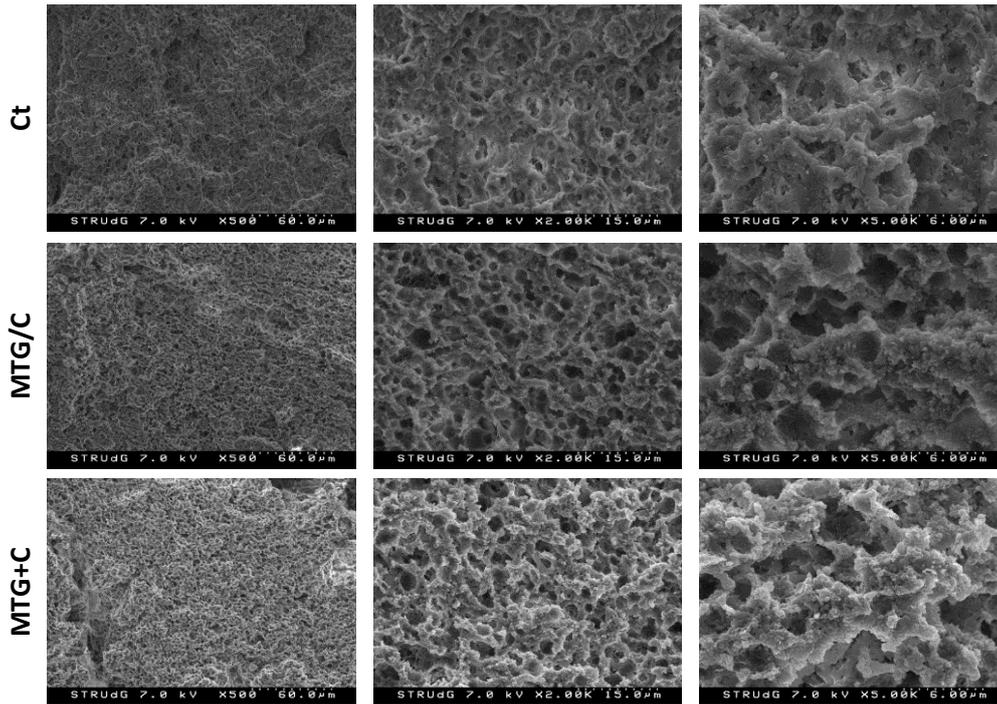


Figura 4.7. Micrografías SEM de los quesos de coagulación enzimática elaborados con Maxiren, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG), en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C)

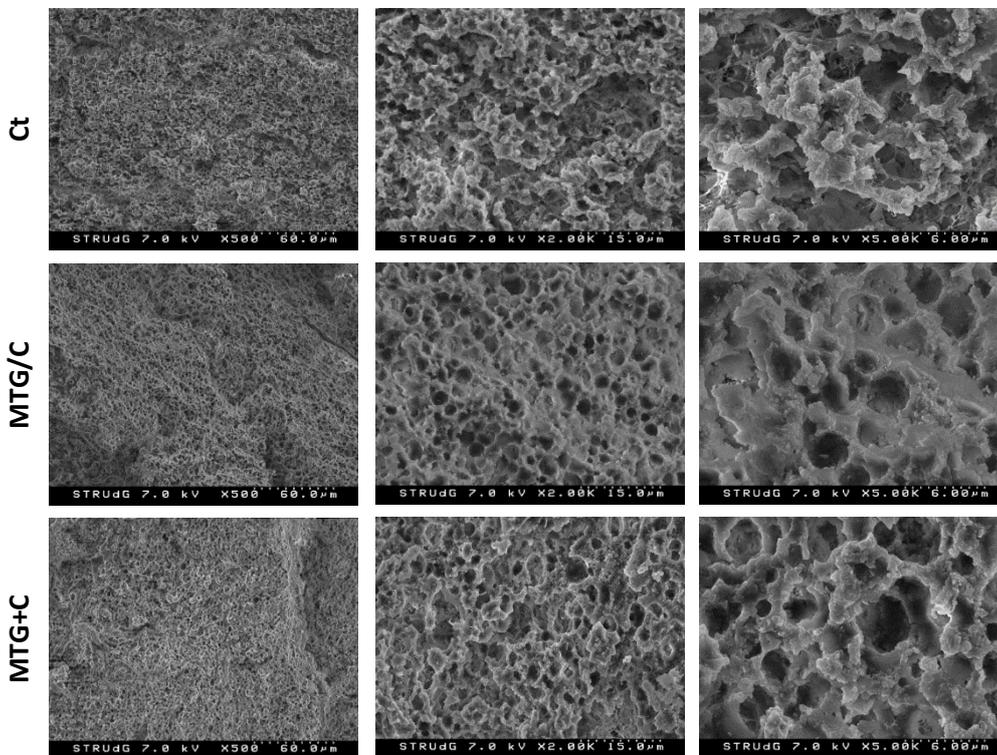


Figura 4.8. Micrografías SEM de los quesos de coagulación enzimática elaborados con Fromase, en función del tratamiento o no con *MTGasa* (MTG) en distintas etapas del proceso de elaboración de queso (Ct, MTG/C, MTG+C)

4.3 Conclusiones

Globalmente, el presente estudio muestra que los tratamientos con *MTGasa* previamente a la adición del cuajo o conjuntamente, independientemente del tipo de cuajo, permiten incrementar el rendimiento quesero en un grado similar. Aunque esto parece estar relacionado con la disminución de la dureza de los quesos tratados en relación con los quesos Control, los valores obtenidos pueden considerarse adecuados teniendo en cuenta las características texturales de los quesos comerciales. Estos resultados contrastan con los mostrados por otros autores, según los cuales los mejores resultados se obtienen cuando el tratamiento con *MTGasa* se realiza conjuntamente con el cuajo o después de la coagulación en comparación con el tratamiento enzimático previo, lo que atribuyen a un posible impedimento en la acción del cuajo por entrecruzamientos iniciales del dominio C terminal de la κ -CN rica en residuos de glutamina por acción de la *MTGasa* (Fernandes de Sá y Bordignon-Luiz, 2010). Teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento y considerando que un aumento del tiempo de incubación previo al corte de la cuajada aumentaría los costos de producción, el tratamiento MTG+C podría considerarse el más adecuado desde un punto de vista empresarial.

CAPÍTULO 5.

ELABORACIÓN DE ANÁLOGOS DE QUESO DE COAGULACIÓN ENZIMÁTICA CON ADICIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (*MTGasa*)

El objetivo de este apartado del trabajo fue elaborar y caracterizar análogos lácteos que se asemejaran a un tipo de queso fresco de coagulación enzimática, a partir de un concentrado de proteína de leche (MPC en sus siglas en inglés) y de nata comercial, utilizando dos cuajos diferentes (CHY-MAX y Fromase), y evaluar el efecto de la adición de distintos niveles de *MTGasa* durante el proceso de elaboración del análogo sobre las características del producto final. Concretamente, el presente trabajo se centró en determinar los efectos de los factores anteriormente mencionados en la textura de los análogos de queso y su capacidad de retención de agua.

Cabe señalar que este estudio se planteó como una aproximación a la obtención de quesos frescos ultrafiltrados (UF), en cuya elaboración la leche previamente pasteurizada se somete a un proceso de ultrafiltración para concentrar la proteína y la grasa de la leche, eliminándose a través del permeado azúcares y sales, entre otros. Una vez concentrada la leche, el queso se obtiene cuajándola en el mismo envase en el que se va a comercializar, ya sea añadiendo fermentos o cuajo, de manera que no hay pérdidas de materia. Algunos fabricantes de instalaciones para la elaboración de quesos UF mantienen que se requiere hasta un 20% menos de leche para producir la misma cantidad de queso fresco (pH OSVER Fluids Engineering, 2013).

Para la realización de este estudio, se partió de una mezcla de MPC y nata en unas cantidades tales que permitieran obtener valores de contenido en proteína y grasa similares a los de quesos frescos UF, y se apostó por la coagulación enzimática con la intención de obtener un producto tipo queso de Burgos, elaborado con leche de vaca, muy popular en la actualidad entre los consumidores españoles, y que se caracteriza por su color blanco, su sabor suave y su textura blanda.

5.1 Diseño Experimental

Se aplicó un diseño en bloques completos al azar, considerando los días experimentales (3) como bloques, para determinar los efectos del tratamiento de la mezcla de MPC y nata comercial con distintos niveles de *MTGasa*, en función del tipo de cuajo utilizado (CHY-MAX o Fromase), sobre: a) la textura de los análogos de queso a partir de la determinación de la dureza, la firmeza, la consistencia y la adhesividad; b) su capacidad de retención de agua, determinada utilizando un método basado en la sinéresis forzada; y c) los perfiles proteicos de la fracción caseínica de los análogos de queso obtenidos mediante la técnica SDS-PAGE en condiciones reductoras. Para cada tipo de cuajo, se ensayaron tres niveles diferentes de *MTGasa* (1, 3 y 5 U·g⁻¹ de proteína, equivalentes a 1, 3 y 5 g MTG·kg⁻¹) junto con el tratamiento Control (0 U·g⁻¹ de proteína).

Además, se llevó a cabo una caracterización fisicoquímica tanto de los ingredientes utilizados para la obtención de los análogos de queso como de los análogos obtenidos, en ambos casos como parámetros de control. Concretamente, en el caso de los ingredientes se determinó el contenido en humedad y de proteína, y para el concentrado de proteína láctea se determinó además el contenido de cenizas, la actividad de agua y el perfil electroforético.

Para tener una referencia, se determinó también la textura de quesos frescos UF comerciales de dos marcas distintas, concretamente Burgo de Arias y Hacendado.

5.2 Resultados y discusión

5.2.1 Caracterización fisicoquímica de los ingredientes

Para proceder a la elaboración de los análogos de queso, se determinó inicialmente la composición de los ingredientes empleados en su elaboración, concretamente el concentrado de proteína MPC 65 y la nata comercial (Tabla 5.1), para poder establecer la formulación teniendo en cuenta los valores de contenido de proteína y grasa que se requerían en el producto final. Como puede observarse, el contenido de agua del concentrado de proteína láctea era suficientemente bajo como para garantizar su estabilidad durante su almacenamiento, atendiendo al valor de actividad de agua obtenido. En productos deshidratados, se recomienda

que su valor de actividad de agua sea ligeramente superior al valor de la capa molecular (aproximadamente 0.2), ya que la actividad relativa correspondiente a las distintas reacciones de deterioro -ya sean microbiológicas, químicas o bioquímicas- están minimizadas (Labuza *et al.*, 1972). Cabe señalar que valores inferiores a este valor no son los más adecuados para la mayoría de productos, debido al efecto protector que juega el agua frente a la oxidación al limitar la accesibilidad de los agentes oxidantes (Martínez y Labuza, 1968; Ramakrishnan y Francis, 1979; Lajolo y Lanfer-Marquez, 1982). Dicho producto presentaba también un contenido de cenizas relativamente elevado, aunque frecuente en este tipo de productos (Think USA Dairy, 2017), así como un contenido de proteína correspondiente con lo esperado (alrededor del 65%). En este sentido, cabe recordar que los MPC son identificados con un número que representa su contenido proteico. Además, el análisis electroforético del concentrado utilizando la técnica SDS-PAGE en condiciones reductoras mostró que su perfil proteico se asemejaba mucho al de la leche cruda (Figura 5.1). De hecho, esto era lo esperado debido a que los MPC, los cuales se obtienen por UF, mantienen la relación caseína:proteína de suero equivalente al de la leche.

Tabla 5.1. Caracterización fisicoquímica de los ingredientes utilizados para la elaboración de los análogos de queso de coagulación enzimática: concentrado de proteína de leche (MPC 65) y nata láctea comercial. Media (\pm SD en el caso de la nata para n=3)

Ingrediente	Humedad (%)	aw	Proteína (%)	Cenizas (%)
MPC 65	2.64	0.229	65.79	7.68
Nata	56.21 \pm 0.15	-	2.31 \pm 0.10	0.39 \pm 0.01

La nata comercial empleada como fuente de grasa presentó un contenido de agua de alrededor del 56%, 2% de proteína y 0.4% de cenizas, coincidiendo con los valores reportados por el productor. Aunque no se determinó ni el contenido de grasa ni el de carbohidratos, de acuerdo con dichas especificaciones, eran de 39% y 2.7%, respectivamente.

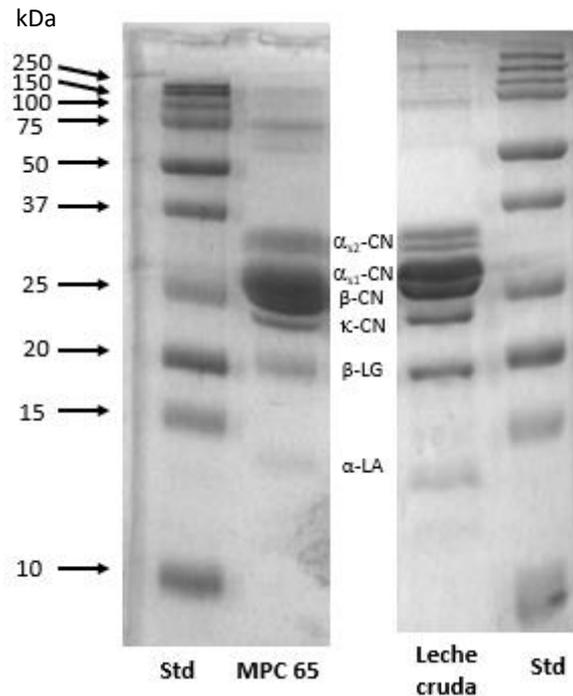


Figura 5.1. Perfiles electroforéticos del concentrado de proteína de leche MPC 65 y de leche cruda, obtenidos con la técnica SDS-PAGE en condiciones reductoras. Std: estándares de peso molecular

5.2.2 Caracterización fisicoquímica de los análogos de queso

Los datos de composición de los análogos de queso se emplearon como parámetros de control de proceso, para poder verificar que los quesos obtenidos se ajustaran a los contenidos de humedad y proteína formulados. En este sentido, debe tenerse en cuenta que la preparación de los quesos análogos no implica separación de fases, cambios en la composición, ni mermas relacionadas, ya que el suero obtenido normalmente durante la producción de quesos naturales ya ha sido retirado por UF o mediante el uso de concentrados lácteos en polvo, como el MPC empleado en este estudio. Esto concuerda con los resultados del análisis estadístico aplicado sobre los datos de contenido de humedad y de proteína de los quesos análogos obtenidos en este estudio, los cuales no reflejaron un efecto significativo ($p > 0.05$) en relación con el tipo de cuajo empleado, así como tampoco por parte del tratamiento con *MTGasa* aplicado. El porcentaje de humedad de los quesos en general se mantuvo alrededor del 66%, mientras que el contenido de proteína fue de aproximadamente el 11%, tanto en los quesos elaborados con CHY-MAX como con Fromase, los cuales son consecuentes con la formulación inicial del queso (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Caracterización fisicoquímica de los análogos de queso de coagulación enzimática, obtenidos en función del tipo de cuajo y el nivel de *MTGasa*. Medias \pm SD (n=3)

Cuajo	<i>MTGasa</i> (U·g ⁻¹ proteína)	Humedad (%)	Proteína (%)	pH
CHY-MAX	0	66.73 \pm 1.32	11.43 \pm 0.23	6.48 \pm 0.06
	1	66.03 \pm 1.58	11.38 \pm 0.12	6.50 \pm 0.06
	3	65.45 \pm 0.24	11.16 \pm 0.71	6.51 \pm 0.07
	5	66.62 \pm 0.16	11.48 \pm 0.32	6.50 \pm 0.06
Fromase	0	66.15 \pm 0.67	11.49 \pm 0.32	6,50 \pm 0,02
	1	66.74 \pm 0.54	11.28 \pm 0.22	6.52 \pm 0.03
	3	66.04 \pm 0.59	11.25 \pm 0.04	6.53 \pm 0.03
	5	66.34 \pm 0.29	11.11 \pm 0.19	6.54 \pm 0.02

5.2.3 Textura de los análogos de queso

La textura de los análogos de queso se caracterizó a partir de la determinación de su dureza, firmeza, consistencia, adhesividad, y la relación entre el trabajo realizado durante la etapa de retirada de la sonda (TUp) y el trabajo positivo total (TT) realizado durante la aplicación del test de penetración.

El análisis estadístico de los resultados correspondientes a los distintos parámetros texturales determinados en los análogos de queso, mostró que el tipo de cuajo utilizado en su elaboración (CHY-MAX o Fromase) solo tenía un efecto significativo ($p < 0.05$) en el caso de la adhesividad. Sin embargo, el efecto del tratamiento con distintos niveles de *MTGasa* variaba en función del parámetro analizado.

En relación con la dureza, se obtuvo que el tratamiento con *MTGasa* afectaba significativamente ($p < 0.05$) este parámetro textural. Sin embargo, de acuerdo con el test de separación de medias de Tukey (Figura 5.2), solo en el caso de los análogos tratados con un nivel de *MTGasa* de 3 U·g⁻¹ proteína, su dureza era significativamente ($p < 0.05$) mayor a la de los elaborados sin tratar con dicha enzima; para los otros dos niveles de enzima ensayados (1 y 5 U·g⁻¹ proteína), los análogos presentaban una dureza intermedia, no mostrando diferencias significativas ($p > 0.05$) con los

tratamientos previamente mencionados, ni entre ellos. Esto parece indicar que, de manera global, el comportamiento de la dureza de los análogos en función del nivel de *MTGasa* adopta una forma de parábola invertida de manera que, inicialmente, a medida que se incrementa el nivel de *MTGasa* aumenta el efecto sobre la dureza hasta un nivel óptimo en el que aquella es máxima y, que, al sobrepasarla, el tratamiento se vuelve menos efectivo.

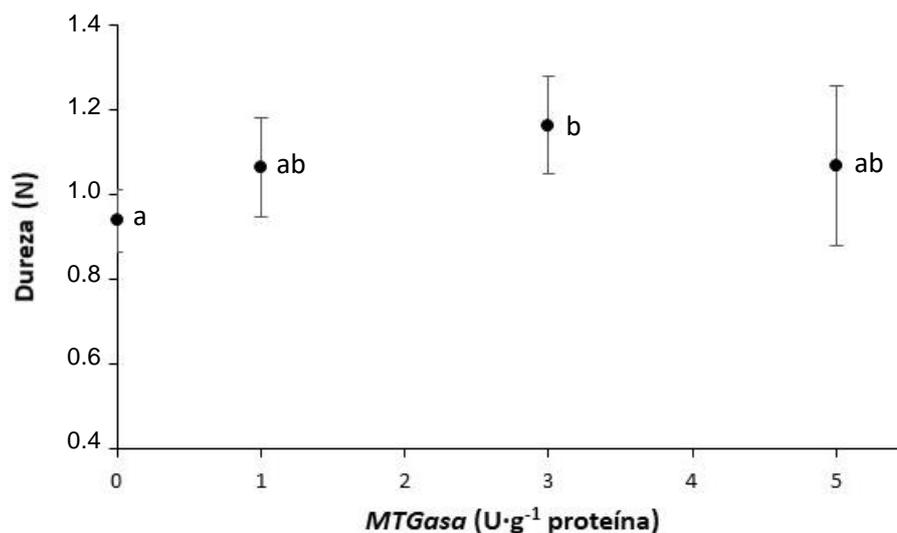


Figura 5.2. Dureza de los análogos de queso elaborados con distintos niveles de *MTGasa*. Medias \pm SD ($n=6$), considerando los resultados para los dos tipos de cuajo ensayados (CHY-MAX y Fromase). Letras distintas indican diferencias significativas entre niveles de *MTGasa*, de acuerdo con el test de separación de medias de Tukey ($p<0.05$)

En la Tabla 5.3 se muestran los valores de firmeza para los análogos de queso, en función del nivel de *MTGasa* aplicado, considerando conjuntamente los datos obtenidos con los dos cuajos distintos. Como puede observarse, su comportamiento es prácticamente idéntico al de la dureza, aunque los valores tienden a ser ligeramente inferiores en algunos tratamientos. En las curvas Fuerza-Tiempo obtenidas durante el test de penetración para los distintos análogos de queso elaborados (Figuras 5.3a y b), se puede constatar que, efectivamente, no en todas las curvas el valor de dureza se consigue al llegar a la distancia máxima de penetración, sino que en algunos tratamientos se obtiene en algún otro momento previo a lo largo del test.

Tabla 5.3. Propiedades texturales (firmeza, consistencia y relación entre trabajo durante la etapa de retirada de la sonda -TUp- y trabajo total -TT-), de los análogos de queso elaborados con distintos niveles de *MTGasa*. Medias \pm SD (n=6), considerando los resultados para los dos tipos de cuajo ensayados (CHY-MAX y Fromase). Letras distintas indican diferencias significativas entre niveles de *MTGasa* distintos, de acuerdo con el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

<i>MTGasa</i> (U·g ⁻¹ proteína)	Firmeza (N)	Consistencia (N·s)	TU/TT
0	0.90 \pm 0.08 a	3.02 \pm 0.25	0.18 \pm 0.01 a
1	1.01 \pm 0.11 ab	3.33 \pm 0.32	0.18 \pm 0.01 a
3	1.15 \pm 0.12 b	3.38 \pm 0.30	0.22 \pm 0.01 b
5	1.05 \pm 0.19 b	3.08 \pm 0.37	0.23 \pm 0.01 b

En conjunto, podría mantenerse que, en las condiciones de proceso establecidas en el presente estudio, la máxima dureza que se puede alcanzar es aproximadamente de 1.20 N y que, a partir de este valor, tiende a mantenerse la fuerza requerida para continuar con el desplazamiento de la sonda hasta la distancia final establecida. Aunque en muchos productos típicamente el valor de fuerza máxima coincide con el final de la penetración, no ocurre siempre así en el caso de los quesos frescos.

Además, y a pesar de que el análisis estadístico no mostró que la interacción entre los dos factores objeto de estudio (tratamiento con *MTGasa* y tipo de cuajo) fuera significativa ($p > 0.05$), las gráficas parecen indicar ligeras diferencias en el comportamiento de la fuerza requerida durante el test de penetración en función del nivel de *MTGasa* para ambos cuajos. En el caso de los análogos elaborados con CHY-MAX (Figura 5.3a), se observa una respuesta bastante similar entre, por un lado, el tratamiento sin aplicación de *MTGasa* y el del nivel más bajo de enzima y, por el otro, entre los dos niveles más elevados de *MTGasa* ensayados. En el primer caso, la fuerza aumenta de manera casi lineal hasta que la sonda alcanza una profundidad de aproximadamente 3 mm; a partir de este momento, la fuerza requerida para continuar con el desplazamiento de la sonda se mantiene prácticamente constante. Sin embargo, ambos tratamientos se diferencian en el valor de fuerza alcanzado en aquel punto, siendo mayor cuando se añade *MTGasa* para la elaboración del análogo. Para los dos niveles de enzima superiores, el aumento de la fuerza durante la penetración aumenta siguiendo prácticamente el mismo patrón que en los tratamientos anteriores, pero en este caso el comportamiento lineal se mantiene hasta aproximadamente los 4 mm de profundidad, tendiendo de una manera

asintótica a la fuerza máxima a partir de este momento, la cual coincide con la distancia final de penetración.

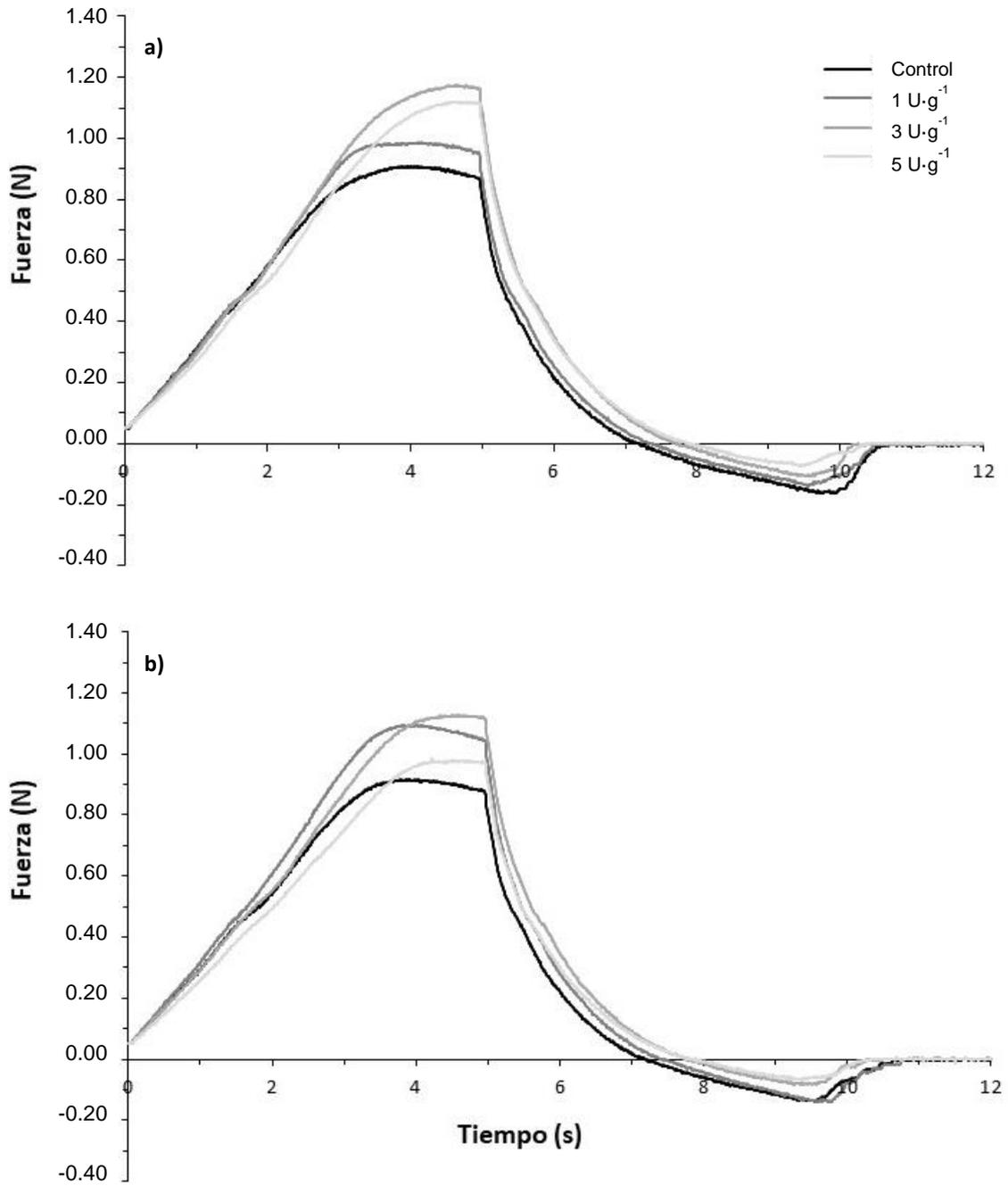


Figura 5.3. Curvas Fuerza-Tiempo correspondientes a análogos de queso tratados con distintos niveles de *MTGasa*, utilizando dos cuajos diferentes: a) CHY-MAX y b) Fromase. Medias (n=6)

En el caso de Fromase (Figura 5.3b), las curvas obtenidas parecen indicar que la acción combinada de dicho agente coagulante y la *MTGasa*, es más eficiente en comparación con la combinación de esta última con CHY-MAX, ya que un valor de dureza alrededor de 1.20 N se consigue ya al nivel más bajo de enzima ($1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína). Además, se observa que la aplicación de un nivel de *MTGasa* de $5 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ proteína no conlleva prácticamente ninguna mejora en relación con el tratamiento Control.

Con relación a las curvas Fuerza-Tiempo, es importante destacar que en todas ellas se evidencia una ligera disrupción en la relación entre ambos parámetros, a una distancia de alrededor de 1.5 mm de la superficie del análogo. Esta alteración del perfil de textura podría estar relacionada con un cambio en la materia del queso análogo; verificando visualmente, se comprobó la existencia de una primera capa más cremosa en la superficie del queso análogo que, alrededor de la distancia mencionada, cambia a una textura más granulosa y ligeramente áspera, posiblemente por problemas de homogeneización de la mezcla con la metodología utilizada en el presente estudio. Sin embargo, también podría ser debida a una pequeña fractura en la estructura del análogo.

En relación con la consistencia, al analizar estadísticamente los resultados de los análogos de queso (Tabla 5.3), se observó un efecto significativo del tratamiento con *MTGasa* sobre dicho parámetro, aunque el valor de probabilidad ($p < 0.043$) era muy próximo al nivel de significación ($\alpha = 0.05$); este hecho podría ser el motivo por el cual el test de separación de medias de Tukey no consiguió separar tratamientos distintos. Aun así, observando las medias obtenidas para cada tratamiento enzimático considerando conjuntamente los resultados obtenidos con ambos cuajos, se intuye también un comportamiento en parábola invertida.

Tal y como se mencionó anteriormente, la adhesividad de las muestras se vio afectada significativamente ($p < 0.05$) no solo por el nivel de *MTGasa* aplicado sino también por el tipo de cuajo empleado, sin una interacción significativa ($p > 0.05$) entre ambos factores. Así, para ambos cuajos, los análogos tratados con los dos niveles superiores de *MTGasa* presentaban una adhesividad significativamente ($p < 0.05$) menor en valor absoluto, que aquellos tratados al nivel más bajo; además, todos ellos eran significativamente ($p < 0.05$) menos adhesivos que los análogos Control (Figura 5.4). En relación al tipo de cuajo, los análogos de queso elaborados con

CHY-MAX presentaban valores de adhesividad en valor absoluto significativamente ($p < 0.05$) superiores a los elaborados con Fromase.

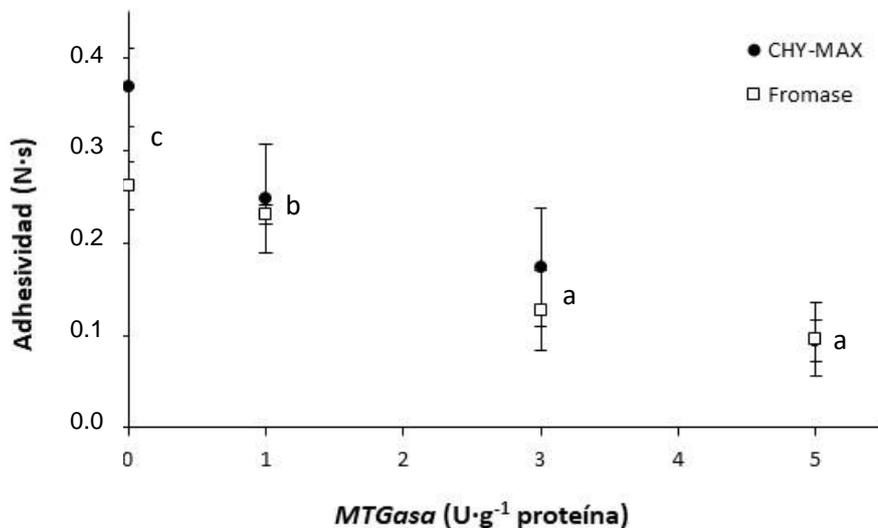


Figura 5.4. Adhesividad (en valor absoluto) de los análogos de queso elaborados con distintos niveles de *MTGasa* en función del tipo de cuajo. Medias \pm SD ($n = 3$). Letras distintas indican diferencias significativas entre niveles de *MTGasa*, de acuerdo con el test de separación de medias de Tukey ($p < 0.05$)

El análisis detallado de las curvas Fuerza-Tiempo permitió también detectar que parecía establecerse una relación negativa entre trabajo positivo correspondiente a la etapa de retirada de la sonda del interior del análogo, y adhesividad, de manera que aquellos tratamientos que mostraron una adhesividad menor, se caracterizaron por un mayor trabajo en la etapa de retirada de la sonda, no solo en valor absoluto sino, más interesante, en relación al trabajo positivo total durante el test de penetración (Tabla 5.3). Estas diferencias pueden suponer un cambio importante en la textura entre los distintos tratamientos con *MTGasa* en relación con el tratamiento sin dicha enzima.

A pesar de haber mostrado que el tratamiento con *MTGasa* para la obtención de los análogos puede tener un efecto positivo sobre su textura, aunque dependiente de su concentración, en las condiciones ensayadas en el presente estudio, las mejoras no fueron suficientes como para garantizar la aceptación del producto elaborado por parte de los consumidores. Su textura se mostró ligeramente arenosa y lejos de la obtención de un gel similar al de los quesos frescos UF comerciales. En la Figura 5.5 se muestran las curvas Fuerza-Tiempo obtenidas durante la aplicación del test de penetración en quesos UF comerciales de dos marcas distintas,

concretamente Burgo de Arias y Hacendado. El análisis de la textura de dichos quesos mostró además que, en comparación con los análogos de queso elaborados en el presente estudio, la firmeza de los quesos UF comerciales era superior. Los valores obtenidos fueron 2.52 ± 0.30 N y 2.81 ± 0.09 N para Burgo de Arias y Hacendado, respectivamente, indicando que la reducción en el valor de este parámetro en los análogos obtenidos en el presente estudio era >1 N. Además, en los quesos UF comerciales los valores de firmeza coincidieron con los de dureza.

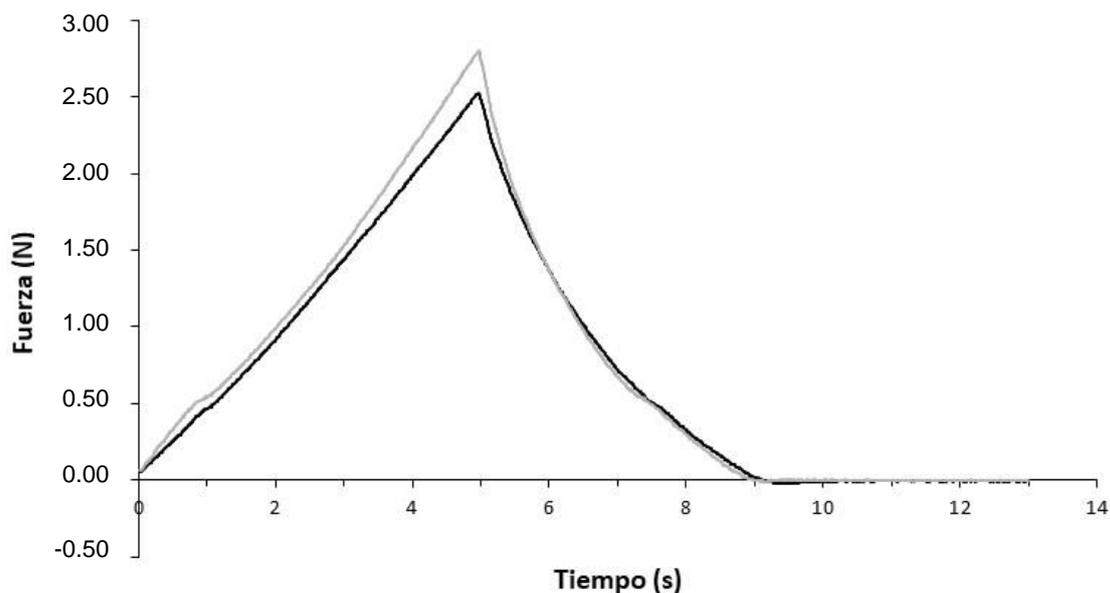


Figura 5.5. Curvas Fuerza-Tiempo correspondientes a quesos UF comerciales: Burgo de Arias, en gris; Hacendado, en negro. Medias (n=6)

Sun *et al.* (2017) llevaron a cabo un estudio de la aplicación de un MPC 80 y su funcionalidad en quesos análogos. Uno de los problemas mencionados acerca del uso del MPC 80 era la formación de grumos en el queso análogo debido a problemas de solubilidad del concentrado de proteína. Como primera solución, Sun y su equipo proponían el tratamiento a elevadas temperaturas de la mezcla de MPC 80 con los otros ingredientes líquidos, lo cual supondría un paso adicional en el proceso de elaboración. Posteriormente se propuso la modificación del MPC 80 con una mezcla de sales fundentes, lo cual incrementaba la solubilidad del concentrado de proteína y mejoraba la textura de los análogos elaborados con el MPC 80 modificado, presentando una masa homogénea, suave y de un color más blanco. Por su parte, las muestras Control poseían una masa heterogénea con gránulos y con una textura áspera, similar a lo descrito anteriormente en los análogos de queso preparados en este estudio, lo cual pudo deberse a una

baja solubilidad del MPC 65 empleado. De acuerdo con Cunha *et al.* (2010), durante la preparación de los quesos análogos, la agitación y el calor provocan la ruptura de enlaces originados por interacciones fuertes y débiles de Van Der Waals, de la red de cristales de triglicéridos que constituyen la grasa (Demman y Beers, 1987), lo que induce la formación de partículas de diámetro variable en la grasa fundida, que son emulsionadas por la proteína láctea. En dicho estudio se observó un incremento en el diámetro de los glóbulos de grasa del queso análogo, en comparación con el queso procesado tradicional, indicando que el proceso de emulsión pudo haber sido insuficiente para romper y dispersar homogéneamente la masa de grasa vegetal empleada. Sin embargo, en el caso de los análogos que aquí se exponen, el uso de nata en lugar de grasa vegetal debería facilitar la obtención de una emulsión más homogénea, ya que, a pesar de presentar una mayor proporción de ácidos grasos saturados, contiene una cantidad importante de ácidos grasos de bajo peso molecular, lo cual reduce su naturaleza no polar y disminuye las fuerzas de atracción entre los glóbulos de grasa, aumentando la afinidad con la red proteica (Cunha *et al.*, 2010). Aun así, la textura áspera y la heterogeneidad de la mezcla análoga obtenida podrían mejorarse trabajando en condiciones que favorecieran la formación de la emulsión, obteniendo una masa de partículas de grasa menores y de tamaños similares, suavizando la textura y evitando la formación de gránulos en el queso análogo.

Liu *et al.* (2008) concluyeron que la firmeza de los análogos de queso evaluados era dependiente de tres factores: la cantidad de agua ligada en el interior de los análogos, el contenido de grasa y el agua libre. Mientras esta última fuera mayor, menor sería la firmeza de las muestras. En dicho estudio, se investigó el uso de un gel de pectina como sustituto de grasa, mostrando también una buena capacidad para retener agua, disminuyendo la cantidad de agua libre y mejorando la textura de los análogos de queso en comparación con la muestra Control.

En la literatura es posible encontrar diferentes estudios acerca de la textura en quesos análogos. Sin embargo, es complejo establecer comparaciones, ya que el nicho de los quesos análogos es muy amplio y variado tanto por la diversidad de los ingredientes que pueden emplearse, como por las propiedades funcionales que puede brindar cada uno y los estudios que se realicen como tal. Por ejemplo, Rehman *et al.* (2003) evaluaron el desarrollo de un queso (no lo consideran un análogo) a partir de un MPC líquido y nata de leche, lo que en principio sería muy similar al presente estudio. Sin embargo, la investigación se centró en aspectos diferentes a los aquí considerados, limitando la posibilidad de comparar los productos obtenidos en cada caso.

5.2.4 Sinéresis forzada

Después de 24 h en refrigeración, posterior al proceso de elaboración, se observó que en general los análogos de queso no presentaban indicios de sinéresis, ya que no se observaba un exceso de suero en ninguna de las tarrinas. Tampoco se evidenciaba pérdida de agua cuando muestras de los distintos tratamientos (incluyendo los controles) se mantenían a temperatura ambiente por un período de 1 h. Lo cual tiene sentido y confirma lo expuesto anteriormente, ya que el contenido de agua en este tipo de productos es muy inferior a la de los quesos naturales, que requieren de un proceso de desuerado e incluso después de ello, retienen gran cantidad de agua en su estructura. De acuerdo con Lucey (2011), los geles elaborados a partir de leche altamente concentrada mediante coagulación enzimática rara vez presentan sinéresis, ya que el número de enlaces proteína-proteína en las cadenas y uniones de la red del gel es considerablemente alto, y por lo que la resistencia a la deformación o a la rotura de la matriz es muy alta como para permitir que ocurra la sinéresis. En este sentido, los quesos análogos del presente estudio, elaborados a partir de un concentrado lácteo obtenido mediante ultrafiltración, presentaban características similares a las de los geles preparados con leche altamente concentrada descritos por Lucey, lo cual explica la baja tendencia a la sinéresis observada en las muestras.

Por este motivo, se procedió a someter nuevas muestras de cada uno de los quesos análogos experimentales, a la determinación de la sinéresis en condiciones forzadas (Figura 5.6). El análisis estadístico de los resultados obtenidos indicó que la interacción entre los tratamientos con *MTGasa* aplicados y el tipo de cuajo empleado para la elaboración de los análogos era significativa ($p < 0.05$), por lo que fue necesario analizar los efectos de la enzima polimerizadora para cada cuajo por separado. Para el caso de CHY-MAX, se obtuvieron efectos significativos ($p < 0.05$) debido al tratamiento con *MTGasa* aplicado, a diferencia de lo que sucedió con los análogos elaborados con Fromase, en cuyo caso no se obtuvo un efecto significativo ($p > 0.05$) para dicho factor. Se sabe que, en el caso de los quesos, la sinéresis depende de varios factores como la composición de la leche, la firmeza del gel a la hora del corte y las condiciones de proceso, entre las que se encuentran el equipo empleado, la acidificación, la proteólisis, entre otros, alguno de los cuales no aplican para el caso de los quesos UF. Otros autores también han estudiado la influencia de la concentración de la leche en la sinéresis de la cuajada, reportando que la permeabilidad del gel disminuye con la concentración de la leche, y de esta forma la sinéresis se ve reducida a medida que aumenta la concentración de proteína (van Dijk y Walstra,

1986; Casiraghi *et al.*, 1989). También se ha demostrado que un aumento de la concentración de grasa en la leche reduce la tasa de sinéresis (Marshall, 1982; Johnston y Murphy, 1984). Al respecto, Mateo *et al.* (2009) reportaron la disminución en el volumen de suero de leche producido por la cuajada al aumentar la concentración de grasa en la leche, apuntando que la producción de suero fue más alta cuando se trabajó con un 0% de grasa, que en los otros niveles de grasa en la leche. En un estudio similar, los resultados indicaron que la liberación del suero en quesos elaborados con leche UF requiere un tiempo mayor debido a la presencia de proteínas concentradas en el retenido que poseen la capacidad de retener agua, así como a la presencia de glóbulos de grasa en la cuajada que prolongan el proceso de sinéresis (Mateva *et al.*, 2013).

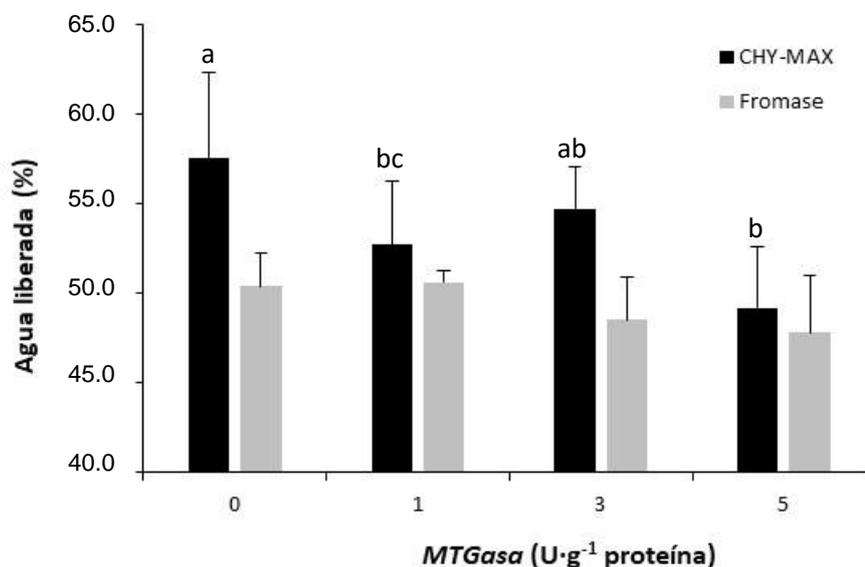


Figura 5.6. Sinéresis forzada expresada como porcentaje de agua liberada de los análogos de queso, tratados con distintos niveles de *MTGasa*, en función del tipo de cuajo aplicado (CHY-MAX o Fromase). Medias \pm SD ($n=3$). Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos relativos a la adición de *MTGasa*, según el test de separación de medias de Tukey ($p<0.05$)

Como puede observarse en la Figura 5.6, los análogos elaborados con Fromase no presentan diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos, a pesar de advertirse una leve tendencia a disminuir el porcentaje de agua liberada a medida que se incrementa la concentración de *MTGasa*. Por el contrario, los análogos tratados con CHY-MAX sí exhiben diferencias significativas ($p<0.05$) en dicho parámetro en función de la concentración de enzima aplicada, aunque con un comportamiento ligeramente irregular. Aun así, quizás pueda mantenerse que con este cuajo la tendencia a perder agua también disminuye a medida que aumenta el nivel de *MTGasa* añadido.

En cuanto al tipo de cuajo empleado, se observa que las muestras preparadas con CHY-MAX presentan en general una mayor sinéresis, con un porcentaje superior de agua liberada en relación con las muestras de Fromase, aunque el aparente mayor efecto de la *MTGasa* sobre la capacidad de retención de agua de los análogos de queso fresco preparados con CHY-MAX, puede resultar de su menor eficiencia en ausencia de *MTGasa* en relación a Fromase. Los resultados obtenidos para este parámetro se asemejan a lo sucedido en el caso de la dureza de los análogos, en el sentido de que parece que hay umbral de mejora de la capacidad de retención de agua que, en las condiciones ensayadas, no es posible traspasarlo sin modificar algún otro factor más allá de la concentración de *MTGasa*.

Cuando se evaluaron las propiedades de los quesos tipo Dambo y Feta producidos a partir de leche UF, con un 2% de quimosina y a concentraciones crecientes de *MTGasa* (Gustaw *et al.*, 2008), se observó que este incremento de la enzima causaba una disminución en la sinéresis del 9.1% al 6.1% en queso Feta y del 17.6 al 6.3% en queso Dambo, concluyendo que la *MTGasa* tiene la capacidad de reducir la sinéresis en quesos elaborados con leche UF. Lo cual se encuentra en correspondencia con el comportamiento presentado por los análogos elaborados con CHY-MAX, en los cuales se observa un cambio importante en la sinéresis entre el Control y los tratamientos con *MTGasa*. En el caso del Fromase no se obtuvieron los mismos resultados respecto a la aplicación de la *MTGasa*.

5.2.5 Perfil proteico

En los geles correspondientes a la fracción caseínica de los análogos de queso (Figura 5.7), se observa una disminución importante en las bandas correspondientes a α_s -CN y β -CN, en mayor grado en las concentraciones superiores de la *MTGasa* para ambos tipos de cuajo. Es notable también la aparición de polímeros proteicos de elevado peso molecular de nueva formación, tanto en la parte superior del gel de separación como en el gel apilador, en los quesos tratados con *MTGasa* en contraste con los controles para ambos cuajos. Incluso, se observa que a medida que aumenta la concentración de la enzima, la cantidad de polímeros disminuye; esto puede deberse a la formación de polímeros de proteína cuyos pesos moleculares no les permiten ni siquiera ingresar en el gel apilador, pero que fue posible observar durante la preparación de las muestras tratadas enzimáticamente como agregados insolubles.

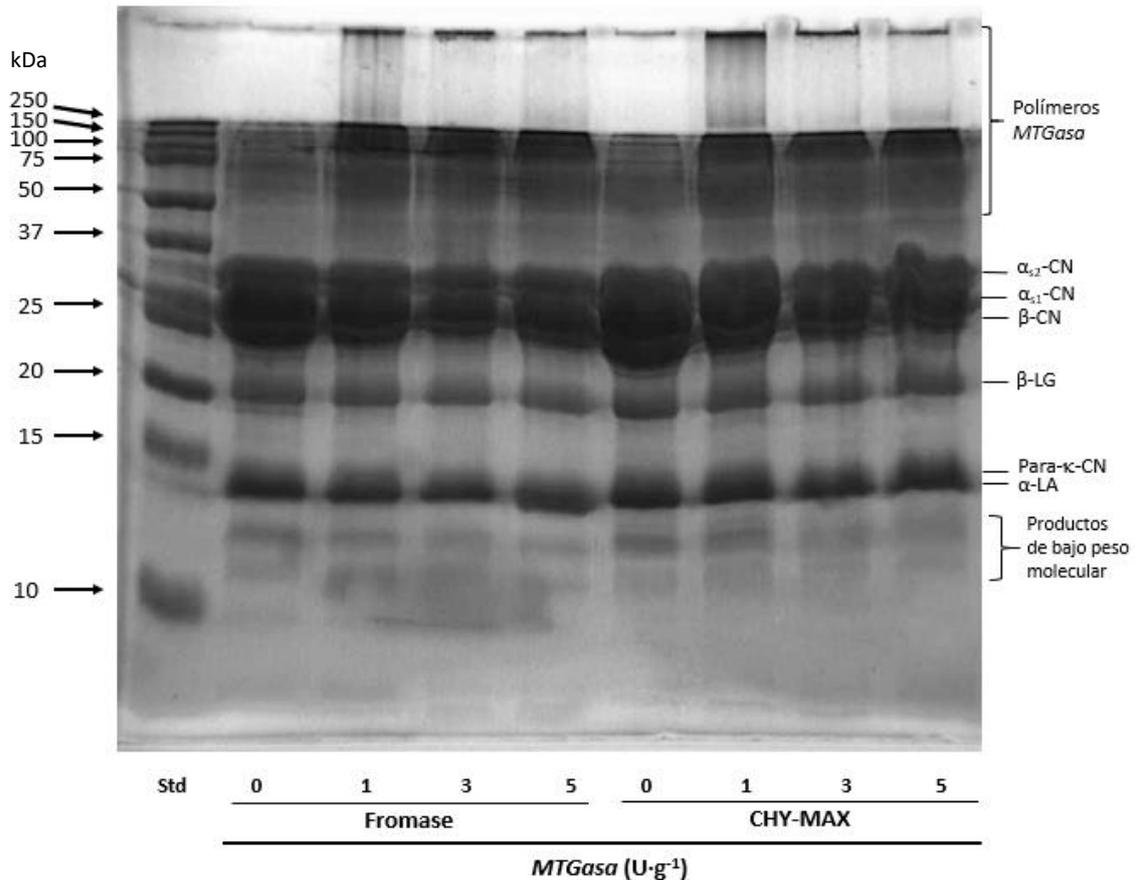


Figura 5.7. Perfiles SDS-PAGE en condiciones reductoras de las fracciones caseínicas de los análogos de queso de coagulación enzimática en función de la concentración de *MTGasa* aplicada para cada uno de los agentes coagulantes ensayados (CHY-MAX, Fromase)

En cuanto a las proteínas séricas, los cambios en las bandas son menores a las que se presentan en las caseínas, pero tanto el tamaño de la banda de la β -lactoglobulina como de la α -lactoalbúmina parecen disminuir con el tratamiento con *MTGasa*, en mayor grado en las muestras de Fromase que en las de CHYMAX, aunque no es muy concluyente debido a las características de gel. Además, se observa una ligera disminución en la intensidad de las bandas de los productos de bajo peso molecular a medida que aumenta la concentración de la *MTGasa*, los cuales podrían haberse incluido en los polímeros formados por la acción de la *MTGasa*. El hecho de que el perfil electroforético se obtuviera en condiciones reductoras y que la única diferencia que existe entre los quesos Control y los tratados enzimáticamente sea la adición de la *MTGasa*, confirma el supuesto de que los cambios observados en las bandas del gel son debidos al entrecruzamiento de las proteínas lácteas por acción de la enzima.

5.3 Conclusiones

La elaboración y caracterización de análogos de queso de coagulación enzimática tipo Burgos permitieron corroborar las diferencias entre los procesos de elaboración de un queso natural y un queso análogo, comenzando por los cambios en el patrón de producción, que solucionarían en cierta medida el problema de la disposición final del suero, debido a que no se obtiene como subproducto en este proceso de producción como tal. Lo cual se confirma con la baja tendencia a la sinéresis que presentaron los quesos análogos después de 24 h de refrigeración, y estaría relacionado con el hecho de que los contenidos de humedad y proteína de los análogos no variaran respecto a lo formulado, de acuerdo con lo que se esperaba según el proceso de producción. Los efectos positivos de la adición de la *MTGasa* en relación con los quesos no tratados obtenidos cuando se evaluó la sinéresis en condiciones forzadas fueron más evidentes en los análogos elaborados con CHY-MAX que en los preparados con Fromase. Si bien es cierto que para CHY-MAX se obtuvieron valores superiores de sinéresis en ausencia de *MTGasa* en comparación con Fromase, la incorporación de la *MTGasa* permitió corregir esa desviación en el comportamiento, provocando que los efectos sobre este parámetro se mostraran más evidentes para este cuajo. Los parámetros de textura evaluados se vieron modificados en mayor o menor medida por la acción de la *MTGasa*, empezando por la dureza de los análogos que solo se vio modificada cuando se empleó una dosis de $3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ de proteína, por encima de la cual el tratamiento con *MTGasa* sería menos efectivo. Un análisis más profundo de las gráficas y parámetros de textura indicó una relación negativa entre la adhesividad y el trabajo positivo durante la etapa de retirada de la sonda del test de penetración en relación al trabajo positivo total, de manera que a menor adhesividad en el análogo mayor sería esta relación, lo cual podría suponer alteraciones importantes en la textura de los análogos como consecuencia de la acción de la *MTGasa*, que podrían ser de interés para la aceptación del producto por parte de los consumidores. Los perfiles electroforéticos de los análogos experimentales tratados con *MTGasa*, confirmarían la participación de la *MTGasa* en el entrecruzamiento de las proteínas, a pesar de que los efectos positivos sobre las propiedades no hayan sido tan evidentes como en los quesos frescos tradicionales estudiados en el presente trabajo. También es cierto que las características de los análogos de queso experimentales deben ser tenidas en cuenta para evaluar nuevas propuestas de elaboración y formulación, así como de la tecnología a emplear, para una mejora de las propiedades de los quesos análogos, ya que tanto su textura como su

apariencia en general distan de parecerse a un queso de Burgos, que fue el producto de referencia del presente estudio.

CAPÍTULO 6.

DISCUSIÓN GENERAL

El queso es uno de los productos lácteos más ampliamente consumidos en el mundo, con una fuente importante de compuestos nutricionales y una estructura compleja que preserva los principales constituyentes de la leche. La expansión del comercio mundial de quesos ha incrementado las distancias entre el productor y el consumidor, lo que supone mayores retos tecnológicos al tiempo que mayores costos tanto de producción como durante la cadena de distribución. Además, para el productor es fundamental mantener una rentabilidad estable a lo largo del tiempo, evitando que esta pueda verse afectada por cambios en el entorno económico y/o productivo debido a variaciones en los precios de las materias primas o por aspectos operacionales de la industria láctea e incluso efectos ambientales, siendo el caso de la variabilidad estacional tanto a nivel de producción como de calidad de la leche (Verdi *et al.*, 1987), lo cual redundaría en efectos sobre la productividad y la calidad del queso. Por otro lado, el mercado se ha vuelto más exigente en cuanto a la demanda de productos más innovadores y con características sensoriales y nutricionales diferenciadas, y al estricto cumplimiento de los estándares internacionales de calidad y seguridad alimentaria (Guinee *et al.*, 2012). Por estos motivos, la industria quesera en general se encuentra trabajando permanentemente entre tres propósitos principales: lograr un queso con una composición y nivel de seguridad alimentaria que cumplan con los estándares establecidos y conseguir la mayor rentabilidad durante el proceso de producción de forma consistente con la aceptación del consumidor.

En este contexto, los avances tecnológicos en la industria láctea resultan de suma importancia para hacer frente al carácter competitivo de dicho sector, permitiendo incrementar la eficiencia productiva al maximizar el aprovechamiento de todos los recursos. En aras de lograr esto, es importante considerar inicialmente las características de la materia prima, y normalmente de manera más específica de sus principales componentes, así como el enfoque que permita sacar el mejor provecho de estos. En este contexto, la *MTGasa* se ha convertido en una de las estrategias emergentes más destacadas dentro de la industria quesera, como una herramienta prometedora para el incremento de los rendimientos y la mejora de las propiedades funcionales y nutricionales de diversos productos (Cozzolino *et al.*, 2003; Huppertz y De Kruif, 2007; Mazuknaite *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2014, Gaspar y De Góes-Favoni, 2015; Prakasan *et al.*,

2015; Danesh *et al.*, 2018; Gharibzahedi *et al.*, 2018). De hecho, el número de patentes existentes indica el gran potencial de la aplicación de la *MTGasa* en la mejora del rendimiento y la funcionalidad del queso, en comparación con quesos elaborados en ausencia del tratamiento enzimático. Este interés por patentar procesos de elaboración de quesos utilizando la *MTGasa* no es reciente (Han y Spradlin, 2000; Kraft Foods, 2000; Han *et al.*, 2003; Yee y Hunt, 2003). El presente trabajo se ha centrado en el estudio de los efectos de su aplicación en dos tipos de queso fresco y una variante adicional, específicamente para un queso de coagulación ácida tipo quark, un queso de coagulación enzimática y un análogo de queso de coagulación enzimática.

Debido a que la *MTGasa* ejerce su acción sobre las proteínas, es importante tener en cuenta las propiedades de las proteínas lácteas, para verificar la idoneidad de aplicar dicha enzima en el proceso de elaboración de queso, con el mejor aprovechamiento posible. Por la alta disponibilidad y relativa facilidad de separación y aislamiento de las proteínas de la leche, muchos trabajos se han centrado en el estudio de sus características, de manera que en la actualidad se cuenta con suficiente información tanto a nivel molecular como acerca de su funcionalidad (Huppertz *et al.*, 2018). La fracción caseínica representa aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche y, en la de origen bovino, está compuesta por cuatro especies de caseínas: α_{S1} -CN, α_{S2} -CN, β -CN y κ -CN, en unas cantidades relativas en la leche de 4:1:4:1, respectivamente (Ruettimann y Ladisch, 1987; Farrell *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2016). Además, se pueden encontrar algunos fragmentos proteicos procedentes de la proteólisis de caseínas; este sería el caso de la γ -CN y la λ -CN derivadas de la β -CN y α_{S1} -CN, respectivamente, generadas debido a la acción de la plasmina presente en la leche (Aimutis y Eigel, 1982; Walstra y Jennes, 1987; Fox y Mulvihill, 1990). En el caso de la β -CN, el fragmento de menor tamaño y de carácter hidrófilo que también se forma como consecuencia de esta reacción se corresponde con la fracción proteosa-peptona. En la leche, las caseínas se encuentran dispuestas en forma de micelas en suspensión gracias al carácter anfifílico de la κ -CN localizada en la superficie micelar. Las distintas caseínas que conforman la micela están ligadas de manera estable por interacciones no-covalentes, básicamente interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que implican el ión calcio. En soluciones puras a pH neutro y en ausencia de calcio, las distintas caseínas presentan una alta tendencia tanto a la autoasociación, especialmente en el caso de la β - y la κ -CNs a través de interacciones hidrofóbicas y, en menor grado, las α_S -CNs, en estas últimas a través de interacciones electrostáticas debido al reparto más homogéneo de las cargas a lo largo de la molécula (Ferrandini *et al.*, 2006).

Las caseínas se caracterizan, por un lado, por tratarse de proteínas con distintos grados de fosforilación -incluso dentro de una misma especie de CN- gracias a la presencia de radicales fosfoserina lo que, junto a la presencia de residuos de ácido glutámico, les confiere un carácter aniónico en medio neutro (Ferrandini *et al.*, 2006). Además, el hecho de que las caseínas estén fosforiladas hace que puedan interaccionar entre ellas gracias al ión calcio, afectando esto su solubilidad y contribuyendo a la formación de las micelas. La κ -CN es la única que frecuentemente solo presenta un residuo fosforilado y, por esto motivo, se la considera insensible al calcio (Müller-Buschbaum *et al.*, 2007), mientras que isoformas de algunas otras caseínas pueden llegar a tener hasta 13 residuos fosforilados, como es el caso de la α_{s2} -CN (West, 1986; Farrell *et al.*, 2004; Holland y Boland, 2014).

Por otro lado, las caseínas presentan de muy pocas a ningún enlace disulfuro. De hecho, en la leche bovina solo se encuentran en la κ - y la α_{s2} -CNs (Rasmussen *et al.*, 1999; Bouguyon *et al.*, 2006). La κ -CN presenta dos residuos de Cys (Cys³² y Cys¹⁰⁹), ambos ubicados en la parte de la molécula correspondiente a la para- κ -CN (Mercier *et al.*, 1973; Rasmussen *et al.*, 1992), los cuales forman un puente disulfuro intramolecular (Rasmussen *et al.*, 1994). Esto hace que casi no posean estructura secundaria, dejando expuestas las partes hidrofóbicas de la cadena de aminoácidos, lo cual proporciona una mayor hidrofobicidad superficial y las hace más vulnerables a la reacción con diversas enzimas, debido al fácil acceso a la cadena principal de la proteína (Swaisgood, 2003; Fox y Kelly, 2006). Además, el hecho de que sea relativamente fácil la desestabilización de las micelas de caseína es lo que realmente hace sencilla tanto la formación de la cuajada mediante la aplicación de un agente coagulante o por coagulación ácida de la leche, como la recuperación de este tipo de proteínas y su aprovechamiento para la elaboración de diferentes productos (Huppertz *et al.*, 2018; Lucey y Horne, 2018).

El otro tipo de proteínas lácteas son las que se encuentran en el suero después de la precipitación de las caseínas, siendo esta la única característica que presentan en común, aunque mayoritariamente también se caracterizan por presentar una estructura globular. En el suero de leche de vaca, la proteína más abundante es la β -lactoglobulina (~50%), seguida de α -lactoalbúmina (~20%), proteosa-peptona (10%), seroalbúmina (~8%) e inmunoglobulinas (8%) (Farrell *et al.*, 2004; Creamer *et al.*, 2011; Innocente *et al.*, 2011; O'Mahony y Fox, 2013). Además, en el suero se encuentran también fragmentos de caseínas que se mantienen solubles una vez han precipitado las caseínas durante el proceso de elaboración del queso.

Atendiendo a la abundancia relativa de las distintas proteínas en el suero, es de esperar que las propiedades funcionales del suero vengan dadas principalmente por las de la β -lactoglobulina y la α -lactoalbúmina; además, son de gran interés su solubilidad en un extenso rango de pH y su perfil nutricional en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales (Kilara y Vaghela, 2018). Por otro lado, en general, se considera que las proteínas del suero contribuyen en una mayor medida al valor nutritivo de la leche y, por tanto, de sus derivados en relación con las caseínas debido a su elevado contenido en aminoácidos esenciales, siendo especialmente relevante su contenido en Ile, Leu, Thr y Trp (Forsum, 1974; Hambroeus y Lönnerdal, 2003). Esto hace que el interés por la valorización del suero de leche vaya más allá de intentar minimizar el impacto medioambiental que conlleva su generación y mejorar la rentabilidad en los procesos de producción de la industria quesera. La retención de las proteínas séricas en la matriz durante el proceso de coagulación de las caseínas en el proceso de elaboración del queso es también una estrategia que se aplica con los mismos objetivos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, debido a la estructura terciaria globular de las proteínas séricas, se hace necesario aplicar métodos físicos, como el calor y las altas presiones, y/o enzimáticos, como el tratamiento con proteasas, para mejorar su capacidad de interactuar con otras proteínas. En este contexto, el tratamiento térmico de la leche previo a la elaboración del queso es una de las opciones más ampliamente utilizadas (Kessler, 1996; Hinrichs, 2001), aunque la aplicación de *MTGasa* está siendo una opción incluso más interesante, especialmente en combinación con el tratamiento térmico. También es posible la fortificación de los quesos con proteínas séricas gracias a su recuperación por ultrafiltración de sueros y posterior adición durante el proceso de elaboración de queso (Hinrichs, 2001), o bien a través de la aplicación de la ultrafiltración para la elaboración de quesos.

En el caso de la β -lactoglobulina, esta proteína forma un dímero a pH fisiológico el cual se disocia a $\text{pH} < 3.5$ y > 7.5 (McKenzie y Sawyer, 1967), unos rangos de pH fuera de aquel en el que se trabaja en el contexto del presente estudio. Sin embargo, se trata de una proteína que presenta una relativamente baja termoestabilidad lo que hace que, en muchos casos, se provoque su desnaturalización cuando la leche se somete a un tratamiento de pasteurización; lo cual mejora sus propiedades funcionales y facilita su interacción con otras moléculas proteicas. Los cambios que experimenta dicha proteína al aumentar la temperatura están bien establecidos (Rytkönen, 2006). Se sabe que los dímeros de β -lactoglobulina se disocian de manera reversible a una temperatura entre 35 y 55 °C (Sawyer, 2003) y que dentro de este mismo rango de temperatura

se pueden dar también otros cambios conformacionales como la transición de Tanford (Tanford y Taggart, 1961; Sakurai y Goto, 2006). Sin embargo, cambios parcialmente irreversibles ocurren a partir de una temperatura alrededor de los 60 °C, los cuales se vuelven irreversibles a partir de los 80 °C (Casal *et al.*, 1988). Aunque no se haya constatado en el presente estudio debido a que las electroforesis se llevaron a cabo bajo condiciones reductoras, ha sido ampliamente demostrado que a estas temperaturas las proteínas séricas presentan una elevada tendencia a la agregación entre ellas mismas y de manera especial con la κ -CN, a través de enlaces hidrofóbicos y reacciones de intercambio tiol/disulfuro (Lowe *et al.*, 2004), dando como resultado los denominados complejos de proteínas séricas/ κ -CN; de esta manera, parte de las proteínas del suero pueden quedar retenidas en la matriz de la cuajada. La formación de estos complejos covalentes se ha confirmado tanto en muestra aisladas de β -lactoglobulina y κ -CN, así como en leche desnatada y leche desnatada reconstituida, debido a su contenido de una cisteína libre y dos puentes disulfuro expuestos, pero también se ha encontrado evidencia de que la α -lactoalbúmina está implicada significativamente en estos complejos, probablemente de forma similar a como ocurre con la β -lactoglobulina (Lelièvre, 1995; Donato y Guyomarc'h, 2009).

La α -lactoalbúmina, por su parte, presenta la característica de ser más estable en presencia de calcio, ya que lo emplea para crear enlaces intramoleculares que confieren a la molécula una mayor resistencia al desdoblamiento térmico, a diferencia de otras proteínas que tienden a ser más reactivas en presencia del calcio debido a la habilidad de este para promover la formación de enlaces iónicos intermoleculares con la mayoría de las proteínas. Por lo tanto, condiciones favorables de pH y concentración de calcio permitirían a la α -lactoalbúmina permanecer soluble después de ser expuesta a una temperatura de 100 °C (Kilara y Vaghela, 2018). Lo cual dificultaría su inclusión en matrices lácteas, reduciendo el rendimiento del proceso y haciendo necesario recurrir a otro tipo de tecnologías.

En sistemas lácteos en los cuales tanto las caseínas como las proteínas séricas se encuentran disponibles para la acción de la *MTGasa*, las caseínas son el sustrato preferencial sobre las proteínas del suero nativas debido a su mayor accesibilidad y flexibilidad (Han y Damodaran, 1996; Jaros *et al.*, 2007; Lucey, 2009; Martins *et al.*, 2014). Aun así, las distintas caseínas presentan diferentes niveles de sinergia con la *MTGasa*. La κ - y la β -CNs muestran mayor reactividad con esta enzima que las α -CNs (Schorsch *et al.*, 2000). La alta susceptibilidad de la

κ -CN se ve favorecida por su localización en la superficie de las micelas y por tener cuatro residuos potenciales de glutamina disponibles como sitios de entrecruzamiento con la *MTGasa*, dos de ellos localizados en la región hidrofílica del CMP (Bönish *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2001). En el caso de la β -CN, su alta susceptibilidad hacia el entrecruzamiento se hipotetiza como debida a su naturaleza dinámica (Sharma *et al.*, 2001). Además, la subfracción β -CN se caracteriza por concentrar un porcentaje relativamente elevado de los residuos de Gln presentes en las proteínas de la leche, concretamente ~33%, siendo solo superada por la subfracción α_{s1} -CN con ~40% (Swaisgood, 1995; Baxter *et al.*, 2004). Aunque en menor grado, está también presente en las otras especies de caseína.

Además, las características moleculares de las caseínas también hacen que puedan ser más fácilmente afectadas por procesos empleados usualmente en la industria láctea para la elaboración de distintos productos lácteos, como la acidificación y la proteólisis enzimática. En este sentido, la acidificación actúa básicamente provocando una neutralización de la carga negativa de las partículas de caseína aprovechando su punto isoeléctrico, lo cual anula la acción estabilizadora de la κ -CN, llevando a la agregación de las micelas de caseína y posteriormente a la formación de una red tridimensional (Kaláb *et al.*, 1983; De Kruif y Zhulina, 1996; Horne, 1998; De Kruif, 1999). La agregación de las micelas de caseína, inducida por la remoción de la capa de κ -CN mediante hidrólisis por acción de un agente coagulante, puede proceder de maneras ligeramente distintas en función del tipo de cuajo utilizado, ya que pueden actuar sobre distintos enlaces peptídicos. Eso puede dar lugar a productos coagulados con propiedades distintas. Aunque se encuentran en la literatura muchos trabajos centrados en el efecto del tratamiento con *MTGasa* durante el proceso de elaboración de quesos de coagulación enzimática (Sayadi *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2014; Domagala *et al.*, 2016; Danesh *et al.*, 2018; Metwally *et al.*, 2018), no abundan los que comparen dicho efecto para cuajos distintos. Este aspecto resulta muy interesante en el caso de empresas productoras de *MTGasa* para poder optimizar las condiciones que permitan obtener los mayores beneficios con la máxima eficacia. Concretamente, en la presente tesis se trabajó comparando tres tipos de cuajo. De un lado, se seleccionaron dos cuajos a base de FPC, aunque obtenidos de microorganismos productores diferentes: el CHY-MAX se deriva de una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamor*, mientras que el Maxiren es producido por *Kluyveromyces lactis*. El tercer cuajo considerado fue el Fromase, una proteasa aspártica como la quimosina, pero de origen fúngico, producida por *Rhizomucor miehei* y una alternativa a los cuajos de origen animal o elaborados a partir de ingeniería genética, lo

que permite su aplicación en productos en los que la aplicación de aquellos no es deseada por una parte de los consumidores; además, se trata de uno de los coagulantes microbianos más empleados en la industria productora de quesos (Andren, 2011). Los dos cuajos FPC también son ampliamente comercializados en la industria láctea; de ahí el interés en trabajar con estos cuajos para determinar si alguno presenta mayor grado de sinergia con la *MTGasa* durante el proceso de producción de queso, y evaluar si las diferencias en el origen tanto entre los FPC, como con el cuajo de origen fúngico producen un impacto en la acción de la *MTGasa* sobre la matriz láctea del queso. Cuando el agente coagulante empleado es quimosina animal o FPC, como CHY-MAX o Maxiren, el corte ocurre a nivel del enlace entre los aminoácidos Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶, ubicado en una región rica en restos de prolina y probablemente fácilmente accesible. En este sentido, se ha descrito la presencia de residuos prolilo a ambos lados del enlace que sobresalen de la superficie y que confieren una mayor flexibilidad a la molécula (Ferrandini *et al.*, 2006). De esta forma, se libera el extremo de la κ -CN correspondiente al CMP al suero, dejando la para- κ -CN asociada al resto de la micela, pero incapaz de proporcionar una estabilidad al conjunto, lo que deriva en la agregación de las micelas de caseína y, finalmente, en la gelificación del sistema lácteo. En el caso del coagulante producido por *R. miehei*, como el Fromase empleado en este estudio, además de cortar en la misma posición que los anteriores, es capaz de escindir en otros puntos, causando presumiblemente una extensa hidrólisis no específica sobre la κ -CN y la para- κ -CN (Shammet *et al.*, 1992; Crabbe 2004); se ha demostrado igualmente su actividad proteolítica sobre la α_{S1} -CN y la β -CN (Ustunol y Zeckzer, 1996; Krause *et al.*, 1998), lo que se ha asociado a una mayor generación de péptidos amargos, que afectarían el sabor del queso y un ablandamiento indeseable del producto (Smith *et al.*, 1991; Jacob *et al.* 2011).

El hecho de que las caseínas constituyan un excelente sustrato para la *MTGasa* hace que la aplicación de esta en la leche, previo o durante la elaboración del queso, permita una mayor recuperación de este componente proteico mayoritario, mediante el entrecruzamiento con las mismas caseínas o con otras proteínas séricas presentes. En este sentido, cabe señalar que la Lys también está presente en las proteínas de la leche, ocupando el segundo lugar en abundancia de entre los aminoácidos esenciales (Rafiq *et al.*, 2016). Los perfiles SDS-PAGE obtenidos en condiciones reductoras de la fracción caseínica de los quesos evaluados en el presente estudio, ya fueran de coagulación ácida como enzimática, hicieron evidente que tanto proteínas séricas como caseínas están involucradas en las reacciones de entrecruzamiento por

acción de la *MTGasa*. Dichas interacciones se pudieron identificar comparando el patrón de bandas de los quesos tratados y sin tratar con la enzima, ya que en los perfiles correspondientes a las muestras tratadas con *MTGasa* se evidenciaba claramente la formación de nuevos polímeros de alto peso molecular en la parte superior del gel, entre los estándares de 50 y 250 kDa; incluso algunos debido a su mayor peso molecular no conseguían ingresar y podían identificarse con una banda más oscura en la parte superior del gel apilador, que no era visible en las muestras Control. La aparición de estos polímeros de nueva formación era concomitante al hecho de que bandas correspondientes a las tres especies de caseínas -en diferente medida- y a las proteínas séricas en menor grado, disminuían en tamaño e intensidad respecto a las muestras preparadas en ausencia de la enzima. Como ya se ha comentado anteriormente, la estructura flexible y la práctica ausencia de enlaces disulfuro de las caseínas las hace más susceptibles al entrecruzamiento por *MTGasa* (O'Connell y Fox, 2000; Moon *et al.*, 2009) que las proteínas séricas, debido a su estructura globular compacta (Matsumura *et al.*, 2000; Hsieh y Pan, 2012).

La formación de polímeros de alto peso molecular por la catálisis de la *MTGasa*, tanto en los quesos de coagulación ácida como enzimática, también implicó cambios en la microestructura del queso. En ambos tipos de producto la aplicación de la enzima provocó alteraciones en el patrón de porosidad y en la conformación y distribución de los agregados proteicos. En los quesos de coagulación ácida, en cuyo caso el objetivo era determinar el efecto de la concentración de *MTGasa*, el efecto de la enzima estuvo relacionado con la consecución de una estructura más compacta y organizada, con agregados proteicos más unidos en una estructura cerrada y una red más fina, con menos cavidades y depresiones de las que se encuentran en la microestructura irregular de los quesos no tratados. Ensayos similares reportados en la literatura, dan cuenta de la obtención de redes con estructuras más finas y de una distribución más sistemática, así como con una organización más pareja de los agregados de proteína en geles lácteos acidificados tratados con *MTGasa*, en comparación con los no tratados (Faergemand *et al.*, 1999; Şanlı *et al.*, 2011). Sin embargo, este estudio también mostró que el tratamiento con una concentración excesiva de *MTGasa*, más allá de la que podría considerarse óptima, conlleva un retroceso en las mejoras obtenidas a nivel de microestructura. Resultados acerca de un efecto perjudicial debido a una sobredosificación de *MTGasa* han sido también reportados por otros autores trabajando en matrices alimentarias distintas (Asagami *et al.*, 1995; Imm *et al.*, 2000; Saguer *et al.*, 2007). De aquí la importancia de establecer el nivel de

enzima más adecuado, teniendo en cuenta las características de la materia prima sobre la que debe actuar, entre ellas la concentración de sustrato. Un exceso de sustrato en relación con la enzima puede inhibir el desarrollo de una red proteica uniforme (Gaspar y de Góes-Favoni, 2015).

En los quesos preparados con cuajo se presentaron también diferencias notables en la microestructura, en este caso relacionadas tanto con el tipo de agente coagulante empleado como con el momento de adición de la *MTGasa* durante el proceso de elaboración del queso, trabajando siempre con el mismo nivel de esta última enzima. En relación al tipo de cuajo, Soltani *et al.* (2016) obtuvieron resultados semejantes. Estos autores compararon el efecto de la adición de un coagulante de origen fúngico y un FPC de camello sobre la microestructura de queso blanco iraní, y concluyeron que con el coagulante fúngico los poros del gel eran más grandes en comparación con los producidos con FPC. En el caso de los quesos experimentales de coagulación enzimática elaborados en el contexto de esta tesis, hubo un impacto similar sobre el tamaño del poro de los FCP en relación con coagulante fúngico, y también en la manera en la que están conformados y distribuidos los agregados proteicos. Incluso se obtuvieron diferencias entre los dos cuajos FPC. Por lo que se refiere al tratamiento con *MTGasa*, es importante remarcar que el enfoque de su efecto en la elaboración de queso fresco de coagulación enzimática fue considerado desde una perspectiva diferente, teniendo en cuenta las interacciones que se podrían presentar entre el agente coagulante y la *MTGasa*, por lo que se evaluó la adición de esta última en diferentes etapas del proceso de producción. Para los distintos cuajos utilizados, fue posible observar que el tratamiento con *MTGasa* permitía obtener en cualquier caso una estructura más definida y uniforme, con la formación de poros más bien determinados y abundantes en relación a los quesos obtenidos sin la aplicación de *MTGasa*, lo que podría tener un efecto importante en la capacidad de retención de agua de los quesos tratados. Además, entre los tratamientos con *MTGasa* también se observó que el momento de adición de la enzima (previa o conjuntamente a la adición del cuajo) afectaba las características de la microestructura, mostrándose más uniforme y con mayor cantidad de poros y mejor definidos en el caso del tratamiento con ambas enzimas por separado.

El impacto en la microestructura por adición de la *MTGasa* también se vio reflejado en la textura de los quesos. En los quesos de coagulación ácida, esta cambió en consonancia con los efectos observados a nivel de microestructura. En este sentido, el incremento en la dureza de los quesos

tratados con la enzima, en relación al tratamiento Control, estaba estrecha y directamente relacionado con las mejoras a nivel de microestructura. Además, las mejoras en microestructura y textura se correspondían con mejoras a nivel de composición, concretamente de contenido en proteínas. Este triángulo interactivo parece lógico. Otros autores, trabajando con geles lácteos desarrollados mediante acidificación, han observado también que el entrecruzamiento de las proteínas por acción de la *MTGasa* da como resultado aumentos en la firmeza del gel además de una mayor facilidad en el drenaje del suero, incluso en casos en que la cantidad de entrecruzamientos ha sido muy baja (Færgemand *et al.*, 1999; Lauber *et al.*, 2000; Schorsch *et al.*, 2000). En el presente estudio, también se observó un cambio en el patrón de drenaje de suero en el mismo sentido.

Sin embargo, en los quesos de coagulación enzimática, por el contrario, el hecho de presentar una estructura con mayor número de poros estuvo ligado a una disminución de la dureza de los quesos. En estos no hubo un incremento en el contenido de proteína, en relación con los tratamientos Control, que permitiera el refuerzo de la estructura tridimensional, pero si una ligera tendencia a presentar un mayor contenido de agua. Esto resultó en productos con valores de dureza menores en comparación con los de los quesos no tratados. Este comportamiento en relación a la textura en quesos de coagulación enzimática coincide con diferentes estudios reportados anteriormente en la literatura. Algunos autores también lo atribuyen a que el entrecruzamiento catalizado por acción de la *MTGasa* impediría la liberación del CMP de la superficie micelar, por la alta afinidad de la κ -CN para interactuar con la *MTGasa*, alterando y alargando el proceso de coagulación; incluso algunos mantienen que se inhibe el proceso de coagulación, cosa que no ocurrió en el presente trabajo cuando el tratamiento con *MTGasa* se realizó previamente a la adición del cuajo (Bönisch *et al.*, 2008; Mahmood y Sebo, 2009; Ozer *et al.*, 2012; Domagala *et al.*, 2016; Metwally *et al.*, 2018). Aunque las curvas de coagulación obtenidas en el presente estudio reflejaron un retraso en el tiempo de coagulación cuando el tratamiento con *MTGasa* se realizó previamente a la adición de cuajo en relación al tratamiento sin dicha enzima, cosa que prácticamente no sucedía cuando *MTGasa* y cuajo se añadían conjuntamente, los resultados en cuanto a rendimiento quesero y características del producto final sugieren que este retraso no tiene mucha relevancia. Según Mahmood y Sebo (2009), el tratamiento con *MTGasa* posterior al corte de la cuajada sería el más adecuado para evitar la reducción en la dureza de los quesos y las pérdidas de proteína y grasa con el suero, en comparación con el tratamiento previo a la adición del cuajo o de manera conjunta,

contrariamente a lo observado en este trabajo (datos referentes al tratamiento posterior, no mostrados). Debido a la gran discrepancia observada entre estudios distintos en cuanto al mejor momento para tratar con *MTGasa* durante el proceso de elaboración de quesos frescos de coagulación enzimática, se precisa profundizar en los factores que pueden alterar el comportamiento de ambas enzimas.

El impacto de los efectos del tratamiento con *MTGasa* a nivel molecular se tradujo, también en ambos tipos de queso, en un incremento en el rendimiento quesero. En el caso del queso de coagulación ácida tipo quark, el rendimiento incrementó de manera lineal con la concentración de *MTGasa* aplicada. Este aumento fue debido, por un lado, a incremento de sólidos retenidos, el cual fue del mismo orden para todos los niveles de enzima ensayados; por el otro, a un aumento en la retención de agua dependiente directamente de la concentración de *MTGasa*. Sin embargo, la retención de agua fue siempre mayor en los quesos control. Mazuknaite *et al.* (2013) reportaron igualmente un incremento en el rendimiento de un tipo de queso tradicional lituano de gelificación ácida, como resultado de un mayor grado de polimerización de las proteínas lácteas por acción de la *MTGasa*, lo que provocó un aumento en el contenido proteico de la cuajada, acompañado de una reducción de este en el suero. Paralelamente, el análisis de la composición química de los sueros y quesos tipo quark del presente estudio reflejó una dinámica similar con un incremento en el contenido de proteína del queso, acompañado de una reducción en el contenido de humedad, coherentes con el comportamiento de la dureza de los quesos y los cambios a nivel de su microestructura, al tiempo que ocurría una reducción y un incremento significativos en el contenido de proteína y de agua, respectivamente, en los sueros, como consecuencia del tratamiento con *MTGasa* en comparación con las muestras Control. Revisiones en la literatura indican un comportamiento similar al mencionado, provocado por la incorporación de la *MTGasa* en la producción de este tipo de queso. De esta forma, en estudios relacionados con la coagulación ácida de la leche, se han reportado incrementos en la firmeza del gel y mejoras en la retención del suero (Schorsch *et al.*, 2000; Jaros *et al.*, 2007; Mazuknaite *et al.*, 2013). Dichos resultados estarían relacionados con la asociación de las micelas de caseína con proteínas séricas desnaturalizadas durante el tratamiento térmico de la leche, quedando estas últimas atrapadas en forma de apéndices filamentosos que resultarían en mayores sitios sobre los cuales actuaría la *MTGasa*, permitiendo un mayor entrecruzamiento de las proteínas y por lo tanto un incremento en la firmeza del queso (Lucey *et al.*, 1998; Anema *et al.*, 2005).

También se confirmó un incremento en el rendimiento de los quesos de coagulación enzimática tratados con *MTGasa* respecto al Control, similar a lo reportado en la literatura para la elaboración de quesos similares (Hu *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2014; Danesh *et al.*, 2018; Metwally *et al.*, 2018). Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, el momento de adición de la *MTGasa* durante el proceso de elaboración del queso no resultó determinante en cuanto al rendimiento quesero. En la literatura, por el contrario, estudios relacionados han obtenido diferencias significativas en el efecto de la adición de *MTGasa*. En los de coagulación enzimática, el rendimiento se vio mejorado por un aumento en el atrapamiento de agua, sin implicar una mayor recuperación de proteínas respecto a los quesos preparados en ausencia de *MTGasa*.

En vista de que el rendimiento del queso depende de factores como la composición química de la leche, la eficiencia en la recuperación de las caseínas y la grasa en el queso, las pérdidas de los constituyentes lácteos en el suero por cuenta de la manipulación de leche y los procedimientos de elaboración del queso, la economía de la producción quesera se fundamenta en maximizar los rendimientos a través de la recuperación eficiente de los componentes de la leche, a la vez que se minimizan las pérdidas de los constituyentes en el suero (Farkye, 2004). El hecho de que la adición de *MTGasa* haya permitido obtener incrementos en los rendimientos de ambos tipos de queso, confirma la versatilidad y robustez de la enzima para catalizar reacciones bajo diferentes condiciones, como lo son la acidificación o la incorporación de un agente coagulante. Al mismo tiempo, la modificación enzimática representa un método útil en vista de la alta especificidad de las reacciones de este tipo y, por lo tanto, de un riesgo menor en la formación de residuos tóxicos en el producto final. Desde el punto de vista industrial, la aplicación de la *MTGasa* resulta mucho más simple y supone cambios mínimos en los procesos de producción, en comparación con otros métodos empleados para la mejora del rendimiento o la retención de proteínas séricas en la cuajada, además de permitir una reducción de los costos de producción al incrementar la cantidad de queso producido a partir de la misma cantidad de leche procesada. Asimismo, un incremento en el rendimiento del queso significa una mejora en la eficiencia del procesado de la leche y un aumento de la rentabilidad de este producto, lo cual puede suponer un gran beneficio y resultar de interés en países subdesarrollados, en los cuales la disponibilidad de la leche puede ser limitada y, por lo tanto, la aplicación de la *MTGasa* resultaría en un mejor aprovechamiento de esta materia prima.

En relación a los análogos de queso fresco de coagulación enzimática tipo Burgos, el tratamiento con *MTGasa* de la mezcla de ingredientes lácteos utilizados para su elaboración, no permitió obtener un producto similar a la referencia comercial deseada, eso es, quesos frescos UF, para ninguno de los cuajos ensayados (CHY-MAX y Fromase). El rango de concentraciones de *MTGasa* ensayado fue suficiente para las condiciones de procesado aplicadas, observándose también que una sobredosificación de enzima podía suponer un retroceso en las mejoras obtenidas. Sería recomendable mejorar el proceso de elaboración, sobre todo en lo relacionado con la etapa de homogeneización de los ingredientes lácteos, antes de proceder a mejorar las características de los productos obtenidos con la aplicación de *MTGasa*.

CAPÍTULO 7.

CONCLUSIONES

Quesos de coagulación ácida tipo quark

1. En quesos frescos de coagulación ácida tipo quark, la adición de transglutaminasa microbiana (*MTGasa*) durante el proceso de elaboración del queso permite incrementar el rendimiento quesero en una forma dependiente de la concentración de enzima en el rango de concentraciones ensayado (0.2 - 0.6 g MTG·L⁻¹). Este incremento es debido a una mayor recuperación de sólidos por acción de la enzima, así como al aumento en la retención de agua en los quesos tratados en función de la concentración de *MTGasa*.
2. El tratamiento con *MTGasa* incrementa el valor nutritivo de los quesos obtenidos debido al aumento en el porcentaje de proteína, aunque la relación que se establece entre concentración de enzima aplicada y porcentaje de proteína en el queso sigue un comportamiento en forma de parábola invertida, indicando que una sobredosisificación de la enzima conlleva un retroceso en las mejoras obtenidas.
3. La dureza de los quesos varía en función de la concentración de *MTGasa* aplicada, siguiendo un comportamiento muy similar al del contenido en proteína y en consonancia con los efectos de la enzima sobre la microestructura de los quesos. En las muestras tratadas con *MTGasa*, se observa una mejora en el grado de estructuración y en el patrón de porosidad de la red proteica en una forma dependiente de la concentración de enzima hasta alcanzar un valor de 0.4 g MTG·L⁻¹.
4. Los cambios en el perfil proteico de los quesos tratados con distintas concentraciones de *MTGasa* respecto al del queso sin tratar, son consistentes con las modificaciones a nivel de composición química y textura.
5. Considerando globalmente los resultados obtenidos, la concentración de *MTGasa* más recomendable para este tipo de queso es 0.4 g MTG·L⁻¹.

Quesos de coagulación enzimática

6. El tiempo de corte de la cuajada para la elaboración de queso fresco de coagulación enzimática utilizando tanto quimosina producida por fermentación (CHY-MAX y Maxiren), como un agente coagulante de origen fúngico (Fromase), se encuentra alrededor de 30 min en las condiciones de incubación aplicadas. Sin embargo, independientemente del cuajo utilizado, el tratamiento de la leche con *MTGasa* previo a la adición del cuajo ralentiza el proceso de coagulación, mientras que la adición simultánea no tiene prácticamente ningún efecto sobre la cinética de coagulación.
7. El tratamiento de la leche con *MTGasa*, ya sea en una etapa previa o de manera simultánea a la acción del cuajo durante la elaboración de queso fresco de coagulación enzimática,

conlleva un incremento en el rendimiento quesero. Esto parece estar relacionado con una mayor retención de agua, aunque los datos de composición química no lo confirman de manera significativa.

8. Independientemente del tipo de agente coagulante utilizado, el tratamiento previo con *MTGasa* a la adición de cuajo disminuye significativamente los valores de dureza del queso respecto al tratamiento Control, aunque se asemejan a los de quesos comerciales del mismo tipo, con lo que podrían considerarse adecuados. La aplicación conjunta de *MTGasa* y cuajo permite obtener quesos con una dureza intermedia entre los dos tratamientos anteriores.
9. La presencia de polímeros de nueva formación de elevado peso molecular en los perfiles proteicos correspondientes a los tratatamientos con *MTGasa*, pone de manifiesto la actividad de entrecruzamiento de esta enzima, aunque con resultados ligeramente distintos en función del origen del cuajo. Si bien la formación de dichos polímeros modifica la microestructura del queso, no se ha evidenciado un efecto positivo significativo sobre su textura, a diferencia de lo que ocurre en los quesos de coagulación ácida.

Análogos de quesos de coagulación enzimática

10. La composición química de los análogos de queso de coagulación enzimática obtenidos bajo cualquiera de las condiciones de elaboración ensayadas en relación con la aplicación o no de *MTGasa* (1, 3 y 5 U·g⁻¹ de proteína) y al tipo de cuajo utilizado (CHY-MAX y Fromase), no se modifica respecto de la formulación inicial.
11. Los perfiles electroforéticos de los análogos de queso elaborados con *MTGasa* confirman su participación en el entrecruzamiento de proteínas lácteas, aunque la formación de polímeros de mayor peso molecular solo se traduce en un incremento significativo de la dureza de los quesos cuando la enzima se aplica a una concentración de 3 U·g⁻¹ de proteína, para cualquiera de los dos cuajos ensayados.
12. Los análogos de queso obtenidos en el contexto del presente estudio se caracterizan por su textura blanda y mayor adhesividad, en comparación con los quesos comerciales de referencia.
13. En general, los análogos de queso elaborados bajo cualquiera de las condiciones contempladas en este estudio tienen poca tendencia a la sinéresis, de manera que el tratamiento con *MTGasa* solo resulta beneficioso en el caso del uso de CHY-MAX como agente coagulante, debido a su menor eficiencia en relación con este parámetro.
14. En las condiciones de proceso aplicadas para la elaboración de los análogos de queso, no es posible obtener los resultados esperados de acuerdo con el producto de referencia considerado.

BIBLIOGRAFÍA.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe S, Yamashita K, Kohno H, Ohkubo Y. (2000). Involvement of transglutaminase in the receptor-mediated endocytosis of mouse peritoneal macrophages. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 23: 1511-1513.
- Achyuthan KE, Greenberg CS. (1987). Identification of a guanosine triphosphate-binding site on guinea pig liver transglutaminase. Role of GTP and calcium ions in modulating activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 262: 1901-1906.
- Adrio JL, Demain AL. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4: 117-139.
- Aeschlimann D, Paulsson M. (1994). Transglutaminases: protein cross-linking enzymes in tissues and body fluids. *Thrombosis and Haemostasis*, 71: 402-415.
- Asagami T, Ogiwara M, Wakameda A, Noguchi SF. (1995). Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. *Fisheries Science*, 61: 267-272.
- Agrawal P, Hassan AN. (2007). Ultrafiltered milk reduces bitterness in reduced-fat Cheddar cheese made with an exopolysaccharide-producing culture. *Journal of Dairy Science*, 90: 3110-3117.
- Agudelo RA, Gauthier SF, Pouliot Y, Marin H, Savoie L. (2004). Kinetics of peptide fraction release during in vitro digestion of casein. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 325-333.
- Aguilar-Zárate P, Aguilar-Zárate M, Carrillo ML, Portilla OM. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Acta Química Mexicana*, 4. 8: 1-17.
- Ahmed NS, Hassan FAM, Salama FMM, Enb AKM. (1995). Utilization of plant proteins in the manufacture of cheese analogs. *Egyptian Journal of Food Science*, 23: 37-45.
- Ahmed SA, Wehaidy HR, Ibrahim OA, El Ghani SA, El-Hofi MA. (2016). Novel milk-clotting enzyme from *Bacillus stearothermophilus* as a coagulant in UF-white soft cheese. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7: 241-249.
- Ahvazi B, Boeshans KM, Rastinejad F. (2004). The emerging structural understanding of transglutaminase 3. *Journal of Structural Biology*, 147: 200-207.
- Ahvazi B, Steinert PM. (2003). A model for the reaction mechanism of the transglutaminase 3 enzyme. *Experimental and Molecular Medicine*, 35: 228-242.
- Aidaros HI, Du G, Chen J. (2011). Microbial fed-batch production of transglutaminase using ammonium sulphate and calcium chloride by *Streptomyces hygroscopicus*. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, 1: 173-178.
- Aimutis WR, Eigel WN. (1982). Identification of λ -casein as plasmin-derived fragments of bovine α_{s1} -casein. *Journal of Dairy Science*, 65: 175-181.
- Ali, NA; Ahmed, SH; Mohamed, ElShazali A; Ahmed, IAM; Babiker, EE. (2011). Changes in functional properties by transglutaminase cross linking as a function of pH of legumes protein isolate. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 10: 2180-2189.
- Alibardi L, Spisni E, Toni M. (2004a). Differentiation of the epidermis in turtle: an immunocytochemical, autoradiographic and electrophoretic analysis. *Acta Histochemica*, 106: 379-395.
- Alibardi L, Toni M. (2004b). Immuno-cross reactivity of transglutaminase and cornification marker proteins in the epidermis of vertebrates suggests common processes of soft cornification across species. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 302: 526-549.

- Alves Macedo JA, Fazani Cavallieri AL, Lopes da Cunha R, Harumi Sato H. (2010). The effect of transglutaminase from *Streptomyces* sp. CBMAI 837 on the gelation of acidified sodium caseinate. *International Dairy Journal*, 20: 673-679.
- Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53: 2613-2617.
- Andrén A. (2011). Cheese: rennets and coagulants. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2^a edición). JW Fuquay, PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 574-578.
- Andrén A. (2016). Chymosin. En: *The Oxford Companion to Cheese*. C Donnelly (Ed.). Oxford University Press, Nueva York, EUA. Pp: 168-169.
- Anema SG, Lauber S, Lee SK, Henle T, Klostermeyer H. (2005). Rheological properties of acid gels prepared from pressure and transglutaminase-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 19: 879-887.
- Anema SG, Li Y. (2003a). Association of denatured whey proteins with casein micelles in heated reconstituted skim milk and its effect on casein micelle size. *Journal of Dairy Research*, 70: 73-83.
- Anema SG, Li Y. (2003b). Effect of pH on the Association of Denatured Whey Proteins with Casein Micelles in Heated Reconstituted Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1640-1646.
- AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC International. (17^a edición). Association of Analytical Communities. Gaithersburg, MD, EUA.
- Asagami T, Ogiwara M, Wakameda A, Noguchi, S. F. (1995). Effect of microbial transglutaminase on the quality of frozen surimi made from various kinds of fish species. *Fisheries Science*, 61: 267-272.
- Augustin MA, Margetts CL. (2003). Milk Powders in the Marketplace. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (2^a Ed.). B Caballero, P Finglas, F Toldra (Eds.) Academic Press. San Diego, CA, EUA. Pp: 4694-4702.
- Autuori F, Farrace MG, Oliverio S, Piredda L, Piacentini M. (1998). "Tissue" transglutaminase and apoptosis. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 62: 129-136.
- Azuma N, Kaminogawa S, Yamauchi K. (1984). Properties of glycomacropeptide and ara- κ -casein derived from human κ -casein and comparison of human and bovine κ -caseins as to susceptibility to chymosin and pepsin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48: 2025-2031.
- Bachmann HP. (2001). Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*, 11: 505-515.
- Bao SS, Hu XC, Zhang K, Xu XK, Zhang HM, Huang H. (2011). Characterization of spray-dried microalgal oil encapsulated in cross-linked sodium caseinate matrix induced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science*, 76: E112-E118.
- Baxter JH, Phillips RR, Dowlati L, Johns PW. (2004). Glutamine in commercial liquid nutritional products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 4963-4968.
- BDF Natural Ingredients SL. (2018). Tocineta reestructurada con Probind[®] GT 5.0. Disponible en: <https://www.bdfingredients.com/es/noticias-transglutaminasa/nuevo-video-de-aplicacion-tocineta-reestructurada-con-probind-gt-50.html>. Fecha de última consulta: 19 de septiembre de 2018.
- Bech L, Rasmussen G, Halkier T, Okada M, Andersen LN, Kauppinen MS, Sandal T. (2002). Transglutaminase from oomycetes. US Patent 6,428,993.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. (2004). *Food chemistry*. Springer, Nueva York, EUA. Pp: 988.
- Beninati S, Piacentini M. (2004). The transglutaminase family: an overview: minireview article. *Amino Acids*, 26: 367-372.
- Bennett RJ, Johnston KA. (2004). General aspects of cheese technology. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Volume 2. Major Cheese Groups (3^a edición). PF Fox, PLH McSweeney TM Cogan, TP Guinee (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 23-50.

- Bi W, Li X, Zhao Y, Zhao W, He S, Ge W, Jiang C. (2016). Imitation cheese manufacture using rapid visco-analyzer and its optimization. *International Journal of Food Properties*, 19: 1053-1064.
- Bin Md Yasir S, Sutton KH, Newberry MP, Andrews NR, Gerrard JA. (2007). The impact of transglutaminase on soy proteins and tofu texture. *Food Chemistry*, 104: 1491-1501.
- Boeshans KM, Mueser TC, Ahvazi B. (2007). A three dimensional model of the human transglutaminase 1: insights into the understanding of lamellar ichthyosis. *Journal of Molecular Modeling*, 13: 233-246.
- Bohdziewicz K. (2010). The influence of transglutaminase on production process, yield and quality of curd cheeses. *Przegląd Mleczarski*, 2: 4-9.
- Bönisch MP, Heidebach TC, Kulozik U. (2008). Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids*, 22: 288-297.
- Bönisch MP, Huss M, Lauber S, Kulozik U. (2007). Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocolloids*, 21: 3-11.
- Bouguyon E, Beauvallet C, Huet JC, Chanut E. (2006). Disulphide bonds in casein micelle from milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343: 450-458.
- Bourneow C, Benjakul S, H-Kittikun A. (2012a). Hydroxamate-based colorimetric method for direct screening of transglutaminase-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 2273-2277.
- Bourneow C, Benjakul S, Sumpavapol P, H-Kittikun A. (2012b). Isolation and cultivation of transglutaminase-producing bacteria from seafood processing factories. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10: 28-39.
- Brunner F, Rosahl S, Lee J, Rudd JJ, Geiler C, Kauppinen S, Rasmussen G, Scheel D, Nurnberger T. (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases *The EMBO Journal*, 21: 6681-6688.
- Buchert J, Ercili-Cura D, Ma H, Gasparetti C, Monogioudi E, Faccio G, Mattinen M, Boer H, Partanen R, Selinheimo E, Lantto R, Kruus K. (2010). *Annual Review of Food Science and Technology*, 1: 113-138.
- Bures DM, Goldsmith LA. (1978). Localization of transglutaminase in adult chicken epidermis. *Archives of Dermatological Research*, 262: 329-332.
- Calvarro J, Perez T, Ruiz J. (2016). Modification of gelatin functionality for culinary applications by using transglutaminase. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 5: 27-32.
- Calvo MM, Law AJR, Leaver J. (1995). Heat-induced interactions between serum albumin, immunoglobulin, and κ -casein inhibit the primary phase of renneting. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43: 2823-2827.
- Candi E, Paradisi A, Terrinoni A, Pietroni V, Oddi S, Cadot B, Jogini V, Meiyappan M, Clardy J, Finazzi-Agro A, Melino G. (2004). Transglutaminase 5 is regulated by guanine-adenine nucleotides. *Biochemical Journal*, 381: 313-319.
- Carbonaro M, Lucarini M, Di Lullo G. (2000). Composition and calcium status of acid whey from pasteurized, UHT-treated and in-bottle sterilized milk. *Nahrung*, 44: 422-425.
- Cariello L, Ristoratore F, Zanetti L. (1997). A new transglutaminase-like from the ascidian *Ciona intestinalis*. *FEBS Letter*, 408: 171-176.
- Casadio R, Polverini E, Mariani P, Spinozzi F, Carsughi F, Fontana A, Polverino de Laureto P, Matteucci G, Bergamini CM. (1999). The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions. *European Journal of Biochemistry*, 262: 672-679.
- Casal HL, Köhler U, Mantsch HH. (1988). Structural and conformational changes of β -lactoglobulin B: an infrared spectroscopic study of the effect of pH and temperature. *Biochimica et Biophysica Acta*, 957: 11-20.

- Casiraghi E, Lucisano M, Peri C. (1989). Rennet coagulation of milk retentates. 2. The combined effect of heat treatments and protein concentration. *Journal of Dairy Science*, 72: 2457-2463.
- Cavalier C, Queguiner C, Cheftel JC. (1990). Preparation of cheese analogues by extrusion cooking. En: *Processing and Quality of Foods*, Vol. 1, High Temperature-Short Time Processing. P Zeuthen, JC Cheftel, C Eriksson, R Gormley, P Linko, Paulus K (Eds.). Elsevier Applied Science Pub. Londres, Reino Unido. Pp: 373-383.
- Chazarra S, Sidrach L, López-Molina D, Rodríguez-López JN. (2007). Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers. *International Dairy Journal*, 17: 1393-1400.
- Chen M-Y, Hu K-Y, Huang C-C, Song Y-L. (2005). More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation. *Developmental and Comparative Immunology*, 29: 1003-1016.
- Chen JS, Mehta K. (1999). Tissue transglutaminase: an enzyme with a split personality. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31: 817-836.
- Chitpinyol S, Crabbe MJC. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Food Chemistry*, 61: 395-418.
- Corpas E, Blackman MR, Roberson R, Scholfield D, Harman SM. (1993). Oral arginine-lysine does not increase growth hormone or insulin-like growth factor-I in old men. *Journal of Gerontology*, 48: M128-M133.
- Coussons PJ, Price NC, Kelly SM, Smith B, Sawyer L. (1992). Factors that govern the specificity of transglutaminase-catalysed modification of proteins and peptides. *Biochemical Journal*, 282: 929-930.
- Cozzolino A, Di Pierro P, Mariniello L, Sorrentino A, Masi P, Porta R. (2003). Incorporation of whey proteins into cheese curd by using transglutaminase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 38: 289-295.
- Crabbe MJC. (2004). Rennet: general and molecular aspects. En: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, General Aspects (3ª edición). PF Fox, PLH McSweeney, TM Cogan, TP Guinee (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 19-43.
- Creamer LK, Loveday SM, Sawyer L. (2011). Beta-lactoglobulin. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2ª Edición). JW Fuquay, PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 787-794.
- Cui L, Du G, Zhang D, Liu H, Chen J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygrosopicus*. *Food Chemistry*, 105: 612-618.
- Cunha CR, Dias AI, Viotto WH. (2010). Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Research International*, 43: 723-729.
- Danesh E, Goudarzi M, Jooyandeh H. (2018). Transglutaminase-mediated incorporation of whey protein as fat replacer into the formulation of reduced-fat Iranian white cheese: physicochemical, rheological and microstructural characterization. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-10.
- Dannenberg F, Kessler H-G. (1988). Reaction kinetics of the denaturation of whey proteins in milk. *Journal of Food Science*, 53: 258-263.
- Darnay L, Dankovics A, Molnár B, Friedrich L, Kenesei GY, Balla CS. (2014). Production of low salt frankfurter with microbial transglutaminase. *Acta Alimentaria*, 43: 45-50.
- Darnay L, Koncz Á, Gelencsér É, Pásztor-Huszár K, Friedrich L. (2016). Textural properties of low-fat set-type yoghurt depending on mTG addition. *Mljekarstvo*, 66: 225-230.
- Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y. (2004). High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase. *Journal of Biotechnology*, 110: 219-226.

- De Jong GAH, Wijngaards G, Koppelman SJ. (2003). Transglutaminase inhibitor from milk. *Journal of Food Science*, 68: 820-825.
- De Kruif CG. (1999). Casein micelle interactions. *International Dairy Journal*, 9: 183-188.
- De Kruif CG, Zhulina EB. (1996). κ -casein as a polyelectrolyte brush on the surface of casein micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 117: 151-159.
- De Souza CFV, Flôres SH, Ayub MAZ. (2006). Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental methods. *Process Biochemistry*, 41: 1186-1192.
- Della Mea M, Caparrós-Ruiz D, Claparols I, Serafini-Fracassini D, Rigau J. (2004). AtPng1p. The first plant transglutaminase. *Plant Physiology*, 135: 2046-2054.
- Demam JM, Beers AM. (1987). Fat crystal networks: Structural and rheological properties. *Journal of Texture Studies*, 18: 303-318.
- Demény MA, Korponay-Szabó I, Fésüs L. (2015). Structure of transglutaminases: unique features serve diverse functions. En: *Transglutaminases: Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery*. K Hitomi, S Kojima, L Fésüs (Eds.). Springer, Japón. Pp: 1-42.
- Dejmek P, Walstra P. (2004). The syneresis of rennet curd. En: *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. Vol 1: General Aspects. P Fox, P McSweeney (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA.
- Di Pierro P, Mariniello L, Sorrentino A, Giosafatto CVL, Chianese L, Porta R. (2010). Transglutaminase-induced chemical and rheological properties of cheese. *Food Biotechnology*, 24: 107-120.
- Dłużewska E, Marciniak-Lukasiak K, Kurek N. (2015). Effect of transglutaminase additive on the quality of gluten-free bread. *Journal of Food*, 3: 80-86.
- Dmytrów I, Jasinka M, Dmytrów K. (2010). Effect of microbiological transglutaminase on selected physicochemical properties of tvarog. *Italian Journal of Food Science*, 4: 449-460.
- Domagała J, Najgebauer-Lejko D, Wieteska-Śliwa I, Sady M, Wszolek M, Bonczar G, Filipczak-Fiutak M. (2016). Influence of milk protein cross-linking by transglutaminase on the rennet coagulation time and the gel properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96: 3500-3507.
- Donato L, Guyomarc'h F. (2009). Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk—A Review. *Dairy Science and Technology*, 89: 3-29.
- Donato L, Guyomarc'h F, Amiot S, Dalgleish DG. (2007). Formation of whey protein/ κ -casein complexes in heated milk: Preferential reaction of whey protein with κ -casein in the casein micelles. *International Dairy Journal*, 17: 1161-1167.
- Drøhse HB, Foltmann B. (1989). Specificity of milk-clotting enzymes towards bovine kappa-casein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 995: 221-224.
- Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, Belkin AM, Colak G, Johnson GVW, Mehta K. (2014). Transglutaminase regulation of cell function. *Physiological Reviews*, 94: 383-417.
- El-Hofi M, Ismail A, Nour M, Ibrahim O. (2014). Isolation, purification and characterisation of transglutaminase from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 13: 267-278.
- Emmons DB. (1990). Milk clotting enzymes. 2. Estimating cheese yield losses from proteolysis during cheese making. *Journal of Dairy Science*, 73: 2016-2021.
- Emmons DB, Becket DC, Binns M. (1990). Milk clotting enzymes. 1. Proteolysis during cheese making in relation to estimated losses of yield. *Journal of Dairy Science*, 73: 2007-2015.
- Emmons DB, Binns M. (1990). Cheese yield experiments and proteolysis by milk-clotting enzymes. *Journal of Dairy Science*, 73: 2028-2043.

- Erwanto Y Kawahara S, Katayama K, Takenoyama S, Fujino H, Yamauchi K, Morishita T, Kai Y, Watanabe S, Muguruma M. (2003). Microbial transglutaminase modifies gel properties of porcine collagen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16: 269-276.
- Escobar D, Arcia P, Curutchet A, Pelaggio R, Urrestarazu P, Márquez R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Revista Del Laboratorio Tecnológico Del Uruguay*, 9: 24-30.
- Esposito C, Caputo I. (2005). Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and physiopathological relevance. *The FEBS Journal*, 272: 615-631.
- Esteves CLC, Lucey JA, Pires EMV. (2002). Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. *International Dairy Journal*, 12: 427-434.
- Færgemand M, Qvist KB. (1997) Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloids*, 11: 287-292.
- Færgemand M, Sorensen MV, Jorgensen U, Budolfsen G, Qvist KB. (1999). Transglutaminase: Effect on instrumental and sensory texture of set style yoghurt. *Milchwissenschaft*, 54: 563-566.
- Famelart MH, Lepesant F, Gaucheron F, Le Graët Y, Schuck P. (1996). pH-Induced physicochemical modifications of native phosphocaseinate suspensions: Influence of aqueous phase. *Lait*, 76: 445-460.
- Fang ZH, Visker MHPW, Miranda G, Delacroix-Buchet A, Bovenhuis H, Martin P. (2016). The relationships between bovine $\alpha_s146146146$ -casein phosphorylation isoforms suggest different phosphorylation pathways. *Journal of Dairy Science*, 99: 8168-8177.
- FAO - Foro de Expertos de Alto Nivel sobre cómo alimentar al Mundo en 2050. 2009. La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf. Fecha de última consulta: 1 de noviembre de 2017.
- FAO, OPS. 2017. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7914s.pdf>. Fecha de última consulta: 11 de noviembre de 2017.
- Farkye NY. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, 57: 91-98.
- Farkye NY, Vedamuthu ER. (2005). Chapter 10 - Microbiology of Soft Cheeses. En: *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products* (3ª edición). RK Robinson (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. Nueva York, EUA. Pp: 479-513.
- Farnsworth JP, Li J, Hendricks GM, Guo MR. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65: 113-121.
- Farran A, Zamora R, Cervera P. (2004). Tablas de Composición de Alimentos del CESNID. McGraw-Hill/Interamericana de España SAU, Aravaca, España. Pp: 247.
- Farrell Jr HM, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87: 1641-1674.
- Farrell Jr HM, Malin EL, Brown EM, Qi PX. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11: 135-147.
- Fernandes CG, Placido D, Lousa D, Brito JA, Isidro A, Soares CM, Pohl J, Carrondo MA, Archer M, Henriques AO. (2015). Structural and functional characterization of an ancient bacterial transglutaminase sheds light on the minimal requirements for protein cross-Linking. *Biochemistry*, 54: 5723-5734.
- Fernandes de Sá EM, Bordignon-Luiz MT. (2010). The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63: 243-251.
- Fernández-Salguero J, Tejada L, Gómez R. (2002). Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 464-468.

- Ferrandini E, Castillo M, López MB, Laencina J. (2006). Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 22: 5-18.
- Ferrer MA, Hill AR, Corredig M. (2008). Rheological properties of rennet gels containing milk protein concentrates. *Journal of Dairy Science*, 91: 959-969.
- Flamm EL. (1991). How FDA approved chymosin: a case history. *Biotechnology*, 9: 349-351.
- Folk JE. (1969). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. VI. Order of substrate addition. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 3707-3713.
- Folk JE, Chung SI. (1973). Molecular and catalytic properties of transglutaminases. *Advances in Enzymology*, 38: 109-191.
- Folk JE, Cole PW. (1965). Structural requirements of specific substrates for guinea pig liver transglutaminase. *The Journal of Biological Chemistry*, 240: 2951-2960.
- Folk JE, Cole PW (1966). Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. *The Journal of Biological Chemistry*, 241: 5518-5525.
- Forsum E. (1974). Nutritional evaluation of whey protein concentrates and their fractions. *Journal of Dairy Science*, 57: 665-670.
- Fort N, Carretero C, Parés D, Toldrà M, Saguer E. (2007). Combined treatment of porcine plasma with microbial transglutaminase and cysteine: Effects on the heat-induced gel properties. *Food Hydrocolloids*, 21: 463-471.
- Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. (2017a). Enzymatic coagulation of milk. En: *Fundamentals of Cheese Science* (2ª edición). PF Fox, TP Guinee, TM Cogan, PLH McSweeney (Eds.). Springer, Nueva York, EUA. Pp: 185-229.
- Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. (2017b). Fresh cheese products: principals of manufacture and overview of different varieties. En: *Fundamentals of Cheese Science* (2ª edición). PF Fox, TP Guinee, TM Cogan, PLH McSweeney (Eds.). Springer, Nueva York, EUA. Pp: 543-588.
- Fox PF, Kelly AL. (2006). Chapter 19. Chemistry and biochemistry of milk constituents. En: *Food Biochemistry and Food Processing*. YH Hui (Ed.) Blackwell Publishing. Iowa, EUA. Pp: 425-452.
- Fox PF, Mulvihill DM. (1990). Chapter 4. Casein. En: *Food Gels*. P Harris (Ed.). Elsevier Applied Science, Nueva York, EUA. Pp: 121-173.
- Gaspar AL, de Góes-Favoni SP. (2015). Action of microbial transglutaminase (*MTGase*) in the modification of food proteins: a review. *Food Chemistry*, 171: 315-322.
- Gauche C, Vieira JTC, Ogliari PJ, Bordignon-Luiz MT. (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, 43: 788-794.
- Gerber U, Jucknischke U, Putzien S, Fuchsbauer HL. (1994). A rapid and simple method for the purification of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Biochemical Journal*, 299: 825-829.
- Gésan-Guizou G. (2010). Chapter 12 - Separation technologies in dairy and egg processing. En: *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*. SSH Rizvi (Ed.). Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Cambridge, Reino Unido. Pp: 341-380.
- Gharibzahedi SMT, Koubaa M, Barba FJ, Greiner R, Georgee S, Roohinejad S. (2018). Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107: 2364-2374.
- González Siso MI. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57: 1-11.
- Griffin M, Casadio R, Bergamini CM. (2002). Transglutaminases: Nature's biological glues. *Biochemical Journal*, 368: 377-396.

- Guastaferro Seravalli E, Iguti AM, Santana I, Finardi Filho F. (2011). Effects of application of transglutaminase in wheat proteins during the production of bread. *Procedia Food Science*, 1: 935-942.
- Guinee TP. (2017). Chapter 46 - Pasteurized Processed and Imitation Cheese Products. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (4ª Ed.). P McSweeney, P Fox, P Cotter, D Everett (Eds.). Academic Press – Elsevier Ltd. Londres, Reino Unido. Pp: 1133-1184.
- Guinee T, O'Callaghan D, O'Brien B, Mullins C, Kelly J. (2012). Updating cheesemaking efficiency. *Teagasc – The Agriculture and Food Development Authority*, Project number: 5979.
- Guinee TP, O'Kennedy BT, Kelly PM. (2006). Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 89: 468-482.
- Gustaw W, Mleko S, Tomczynska-Mleko M. (2008). Production of UF-milk cheeses: Effect of rennet and transglutaminase on coagulation time, texture and syneresis. *Milchwissenschaft*, 63: 141-144.
- Guyomarc'h F, Famelart MH, Henry G, Gulzar M, Leonil J, Hamon P, Bouhallab S, Croguennec T. (2015). Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities - a review. *Dairy Science and Technology*, 95: 795-814.
- Guyomarc'h F, Law AJ, Dalgleish DG. (2003). Formation of soluble and micelle-bound protein aggregates in heated milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4652-4660.
- Guyot C, Kulozik U. (2011). Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 21: 628-635.
- Hambroeus L, Lönnnerdal B. (2003). Nutritional aspects of milk proteins. En: *Advanced Dairy Chemistry. Volume 1. Proteins* (3ª edición). Part B. PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York, EUA. Pp: 607-646.
- Han X-Q, Damodaran S. (1996). Thermodynamic compatibility of substrate proteins affects their cross-linking by transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1211-1217.
- Han X-Q, Pfeifer JK, Lincourt RH, Schuerman JM. (2003). Process of making cheese product using transglutaminase. U.S. Patent 6 572 901 B2, 3 de Junio.
- Han X-Q, Spradlin JE. (2000). Process of making cheese using transglutaminase and a non-rennet protease. European Patent 1 057 411 A2, 6 de Diciembre.
- Harvey J. (2006). Protein fortification of cheese milk using milk protein concentrate - yield improvement and product quality. *Australian Journal of Dairy Technology*, 61: 183-185.
- Hatahet F, Ruddock LW. (2009). Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11: 2807-2850.
- Heck T, Faccio G, Richter M, Thöny-Meyer L. (2013). Enzyme-catalyzed protein crosslinking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 461-475.
- Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B. (2017). Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, 6: 53.
- Hinrichs J. (2001). Incorporation of whey proteins in cheese. *International Dairy Journal*, 11: 495-503.
- Ho M-L, Leu S-Z, Hsieh J-F, Jiang S-T. (2000). Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced from *Streptovercillium ladakanum*. *Journal of Food Science*, 65: 76-80.
- Holland JW, Boland MJ. (2014). Post-translational modifications of caseins (2ª edición). En: *Milk Proteins: From Expression to Food*. H Singh, A Thompson, M Boland (Eds.). Elsevier Inc. San Diego, EUA. Pp: 141-168.
- Holt C, Horne DS. (1996). The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50: 85-111.

- Horne DS. (1998). Casein interactions: Casting light on the black boxes, the structure in dairy products. *International Dairy Journal*, 8: 171-177.
- Hsieh JF, Pan PH. (2012). Proteomic profiling of microbial transglutaminase-induced polymerization of milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 95: 580-589.
- Hu Y-N, Ge K-S, Jiang L, Guo H-Y, Luo J, Wang F, Ren FZ. (2013). Effect of transglutaminase on yield, compositional and functional properties of low-fat Cheddar cheese. *Food Science and Technology Research*, 19: 359-367.
- Huang CJ, Lin H, Yang X. (2012). Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39: 383-399.
- Huang CC, Sritunyalucksana K, Söderhäll K, Song Y-L. (2004). Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 279-294.
- Huppertz T, de Kruif CG. (2007). Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles. *International Dairy Journal*, 17: 442-447.
- Huppertz T, Fox PF, Kelly AL. (2004). Effects of high pressure treatment on the yield of cheese curd from bovine milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5: 1-8.
- Huppertz T, Fox PF, Kelly AL. (2018). Chapter 3. The caseins: Structure, stability, and functionality. En: *Proteins in Food Processing* (2ª edición). RY Yada (Ed.). Woodhead Publishing – Elsevier Ltd. Duxford, Reino Unido. Pp: 49-92.
- Hyslop DB. (2003). Enzymatic coagulation of milk. En: *Advanced Dairy Chemistry, Vol. 1 Proteins* (3ª edición). PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Springer Science+Business Media, Nueva York, EUA. Pp: 839-878.
- Ickeson I, Apelbaum A. (1987). Evidence for transglutaminase activity in plant tissue. *Plant Physiology*, 84: 972-974.
- IDF. (1997). Calf rennet and adult bovine rennet: determination of chymosin and bovine pepsin contents (chromatographic method). International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica.
- Iličić MD, Carić MĐ, Milanović D, Dokić LP, Đurić MS, Bošnjak GS, Duraković KG. (2008). Viscosity changes of probiotic yoghurt with transglutaminase during storage. *Acta Periodica Technologica*, 39: 11-19.
- Imm JY, Lian P, Lee CM. (2000). Gelation and water binding properties of transglutaminase-treated skim milk powder. *Journal of Food Science*, 65: 200-205.
- Innocente N, Biasutti M, Blecker C. (2011). HPLC profile and dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction from bovine milk and from whey protein concentrate. *International Dairy Journal*, 21: 222-228.
- Iranzo M, Aguado C, Pallotti C, Canizares JV, and Mormeneo S. (2002). Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology*, 148: 1329-1334.
- Isidori A, Lo Monaco A, Cappa M. (1981). A study of growth hormone release in man after oral administration of amino acids. *Current Medical Research and Opinion*, 7: 475-481.
- Itaya H, Kikuchi Y. (2008). Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 621-625.
- Iyer PV, Ananthanarayan L. (2008). Review: Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43: 1019-1032.
- Jacob M, Jaros D, Rohm H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 14-33.
- Jaros D, Heidig C, Rohm H. (2007). Enzymatic modification through microbial transglutaminase enhances the viscosity of stirred yogurt. *Journal of Texture Studies*, 38: 179-198.

- Jaros D, Jacob M, Otto C, Rohm H. (2010). Excessive cross-linking of caseins by microbial transglutaminase and its impact on physical properties of acidified milk gels. *International Dairy Journal*, 20: 321-327.
- Jaros D, Partschfeld C, Henle T, Rohm H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37: 113-155.
- Jaros D, Seitler K, Rohm H. (2008). Enzymatic coagulation of milk: animal rennets and microbial coagulants differ in their gelation behaviour as affected by pH and temperature. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1721-1727.
- Javitt G, Ben-Barak-Zelas Z, Jerabek-Willemsen M, Fishman A. (2017). Constitutive expression of active microbial transglutaminase in *Escherichia coli* and comparative characterization to a known variant. *BMC Biotechnology*, 17: 23.
- Jelen P, Renz-Schauen A. (1989). Quarg manufacturing innovations and their effect on quality, nutritive value and consumer acceptance. *Food technology*, 43: 74-81.
- Jin M, Huang J, Pei Z, Huang J, Gao H, Chang Z. (2016). Purification and characterization of a high-salt-resistant microbial transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133: 6-11.
- Johnson ME, Chen CM, Jaeggi JJ. (2001). Effect of rennet coagulation time on composition, yield, and quality of reduced-fat cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 84: 1027-1033.
- Johnston DE, Murphy RJ. (1984). Effects of fat content on properties of rennet-induced milk gels. *Milchwissenschaft*, 39: 585-587.
- Jooyandeh H, Mortazavi SA, Farhang P, Samavati V. (2015). Physicochemical properties of set-style yoghurt as effect by microbial transglutaminase and milk solids contents. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4: 59-67.
- Jozami Barreiro F, Seselovsky R. (2003). Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria. Elaboración de carne reconstituida. *Invenio*, 6: 157-164.
- Junqua M, Duran R, Gancet C, Goulas P. (1997). Optimization of microbial transglutaminase production using experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48: 730-734.
- Kaláb M, Allan-Wojtas P, Phipps-Todd BE. (1983). Development of microstructure in set-style nonfat yoghurt – A review. *Journal of Food Structure*, 2: 51-66.
- Kanaji T, Ozaki H, Takao T, Kawajiri H, Ide H, Motoki M, Shimonishi Y. (1993). Primary structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* sp. strain s-8112. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 11565-11572.
- Kang H, Cho YD. (1996). Purification and properties of transglutaminase from soybean (*Glycine max*) leaves. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223: 288-292.
- Karzan TM, Nawal HS, Ashna TA. (2016). The effect of microbial transglutaminase enzyme on some physicochemical and sensory properties of goat's whey cheese. *International Food Research Journal*, 23: 688-693.
- Kashiwagi T, Yokoyama K, Ishikawa K, Ono K, Ejima D, Matsui H, Suzuki E. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 44252-44260.
- Kelly P. (2011). Milk protein concentrate. En: *Encyclopaedia of Dairy Science*, Vol 3. (2ª edición). JW Fuquay, PF Fox, PLH McSweeney (Eds). Academic Press. San Diego, CA, EUA. Pp: 848-854.
- Kelly PM, Kelly J, Mehra R, Oldfield DJ, Raggett E, O'Kennedy BT. (2000). Implementation of integrated membrane processes for pilot scale development of fractionated milk components. *Lait*, 80: 139-153.
- Kessler HG. (1996). *Lebensmittel- und Bioverfahrenstechnik – Molkereitechnologie*. Verlag A Kessler. Munich, Alemania.

- Kethireddipalli P, Hill AR. (2015). Rennet coagulation and cheesemaking properties of thermally processed milk: Overview and recent developments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63: 9389-9403.
- Kethireddipalli P, Hill AR, Dalgleish DG. (2010). Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. *International Dairy Journal*, 20: 838-843.
- Kieliszek M, Misiewicz A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59: 241-250.
- Kilara A, Vaghela MN. (2018). Chapter 4. Whey proteins. En: *Proteins in Food Processing* (2ª edición.). RY Yada (Ed.). Woodhead Publishing – Elsevier Ltd. Duxford, Reino Unido. Pp: 93-126.
- Kim YS, Huang W, Du G, Pan Z, Chung O, (2008). Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. *Food Research International*, 41: 903-908.
- Kim HS, Jung S-H, Lee I-S, Yu T-S. (2000). Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 10: 187-194.
- Kim H-C, Lewis MS, Gorman JJ, Park S-C, Girard JE, Folk JE, Chung S-I. (1990). Protransglutaminase from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 265: 21971-21978.
- Király R, Thangaraju K, Nagy Z, Collighan R, Nemes Z, Griffin M, Fésüs L. (2016). Isopeptidase activity of human transglutaminase 2: disconnection from transamidation and characterization by kinetic parameters. *Amino Acids*, 48: 31-40.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 345-351.
- Klein JD, Guzman E, Kuehn GD. (1992). Purification and partial characterization of transglutaminase from *Physarum polycephalum*. *Journal of Bacteriology*, 174: 2599-2605.
- Klöck C, Khosla C. (2012). Regulation of the activities of the mammalian transglutaminase family of enzymes. *Protein Science*, 21: 1781-1791.
- Kobayashi K, Hashiguchi K, Yokozeki K, Yamanaka S. (1998a). Molecular cloning of the transglutaminase gene from *Bacillus subtilis* and its expression in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62: 1109-1114.
- Kobayashi K, Suzuki S-I, Izawa Y, Yokozeki K, Miwa K, Yamanaka S. (1998b). Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Journal of General and Applied Microbiology*, 44: 85-91.
- Köksel H, Sivri D, Ng PKW, Steffe JF. (2001). Effects of transglutaminase enzyme on fundamental rheological properties of sound and bug-damaged wheat flour doughs. *Cereal Chemistry*, 78: 26-30.
- Komáromi I, Bagoly Z, Muszbek L. (2010). Factor XIII: novel structural and functional aspects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9: 9-20.
- Kosikowski FV. (1979). Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*, 62: 1149-1160.
- Kraft Foods North America Inc. (2000). Process for making cheese using transglutaminase and a non-rennet protease. Patent EP 1 048 218 A2
- Krause W, Partzsch M, Hassan ZM, Haufe T. (1998). Substrate and binding specificity of aspartic proteases with milk clotting properties. *Nahrung*, 42: 162-165.
- Kulozik U, Tolkach A, Bulca S, Hinrichs J. (2003). The role of processing and matrix design in development and control of microstructures in dairy food production—a survey. *International Dairy Journal*, 13: 621-630.
- Kuraishi C, Sakamoto J, Soeda T. (1997). Process for producing cheese using transglutaminase, Patent number: US5681598.

- Kuraishi C, Yamazaki K, Susa Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17: 221-246.
- Kütemeyer C, Froeck M, Werlein H-D, Watkinson BM. (2005). The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. *Food Control*, 16: 735-737.
- Labuza TP, McNally L, Gallagher D, Hawkes J, Hurtado F. (1972). Stability of intermediate moisture foods. 1. Lipid oxidation. *Journal of Food Science*, 37: 154-159.
- Lajolo FM, Lanfer-Marquez UM. (1982). Chlorophyll degradation in a spinach system at low and intermediate water activities. *Journal of Food Science*, 47: 1995-1998, 2003.
- Lauber S, Henle T, Klostermeyer H. (2000). Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt. *European Food Research and Technology*, 210: 305-309.
- Lauber S, Noack I, Klostermeyer H, Henle T. (2001). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213: 273-276.
- Lee EY, Park J. (2002). Pressure Inactivation Kinetics of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *Journal of Food Science*, 67: 1103-1107.
- Lelièvre J. (1995). Whey proteins in cheese – an overview. En: Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese. Malin EL, Tunick MH (Eds.). Springer Science+Business Media, LLC. NY, EUA. Pp: 359-366.
- Li D, Scherfer C, Korayem AM, Zhao Z, Schmidt O, Theopold U. (2002). Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 919-928.
- Lilley GR, Skill J, Griffin M, Bonner PLR. (1998). Detection of Ca²⁺-dependent transglutaminase activity in root and leaf tissue of monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant Physiology*, 117: 1115-1123.
- Lim T-J, Easa A-M, Karim A-A, Bhat R, Liong M-T. (2011). Development of soy-based cream cheese via the addition of microbial transglutaminase, soy protein isolate and maltodextrin. *British Food Journal*, 113: 1147-1172.
- Lin Y-S, Chao M-L, Liu C-H, Chu W-S. (2004). Cloning and expression of the transglutaminase gene from *Streptovorticillium ladakanum* in *Streptomyces lividans*. *Process Biochemistry*, 39: 591-598.
- Lin Y-S, Chao M-L, Liu C-H, Tseng M, Chu W-S. (2006). Cloning of the gene coding for transglutaminase from *Streptomyces platensis* and its expression in *Streptomyces lividans*. *Process Biochemistry*, 41: 519-524.
- Lin S-J, Hsieh Y-F, Lai L-A, Chao M-L, Chu W-S. (2008). Characterization and large-scale production of recombinant *Streptovorticillium platensis* transglutaminase. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35: 981-990.
- Lindgren M, Riazi R, Lesch C, Wilhelmsson C, Theopold U, Dushay MS. (2008). Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *Journal of Insect Physiology*, 54: 586-592.
- Lipnizki F. (2010). Chapter 1: Cross-flow membrane applications in the food industry. En: Membrane Technology, Volume 3: Membranes for Food Applications. KV Peinemann, S Pereira Nunes, L Giorno (Eds.). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, Alemania. Pp: 1-24.
- Litopoulou-Tzanetaki E. (2007). Chapter 21 - Soft-ripened and fresh cheeses: Feta, Quark, Halloumi and related varieties. En: Improving the Flavour of Cheese. BC Weimer (Ed.). Woodhead Publishing S, Cambridge, UK. Pp: 474-493.
- Liu H, Xu XM, Guo SD. (2008). Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1581-1592.

- Lo CG, Bastian ED. (1998). Incorporation of Native and Denatured Whey Proteins into Cheese Curd for Manufacture of Reduced Fat, Havarti-type Cheese. *Journal of Dairy Science*, 81: 16-24.
- Lo Piero AR, Puglisi I, Petrone G. (2002). Characterization of "lettucine", a serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 2439-2443.
- Lozano-Calleros C, Vernon-Carter EJ, Guerrero-Legarreta I, Soriano-Santos J, Escalona-Beundia H. (1997). Use of fat blends in cheese analogs: Influence on sensory and instrumental textural characteristics. *Journal of Texture Studies*, 28: 619-632.
- Lokko Y, Heijde M, Schebesta K, Scholtès P, Van Montagu M, Giacca M. (2018). Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. *New Biotechnology*, 40: 5-10.
- Lorand L, Conrad S. (1984). Transglutaminases. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 58: 9-35.
- Lorenzen PC. (2000a). Renneting properties of transglutaminase-treated milk. *Milchwissenschaft*, 55: 433-437.
- Lorenzen PC. (2000b). Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins. *Milchwissenschaft*, 55: 667-670.
- Lowe EK, Anema SG, Bienvenue A, Boland MJ, Creamer LK, Jiménez-Flores R. (2004). Heat-induced redistribution of disulfide bonds in milk proteins. 2. Disulfide bonding patterns between bovine beta-lactoglobulin and kappa-casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7669-7680.
- Lucey JA. (2009). Chapter 16 - Milk protein gels. En: *Milk Proteins: from Expression to Food*. A Thompson, M Boland, H Singh (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 449-481.
- Lucey JA. (2011). Curd syneresis. En: *Encyclopedia of Dairy Sciences (2ª Edición)*. JW Fuquay, PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 591-594.
- Lucey JA, Fox PF. (1993). Importance of calcium and phosphate in cheese manufacture: A review. *Journal of Dairy Science*, 76: 1714-1724.
- Lucey JA, Horne DS. (2018). Perspectives on casein interactions. *International Dairy Journal*, 85: 56-65.
- Lucey JA, Maurer-Rothmann A, Kaliappan S. (2011). Chapter 4. Functionality of ingredients: Emulsifying salts. En: *Processed Cheese and Analogues*. Tamime AY (Ed.). Wiley, Reino Unido.
- Lucey JA, Munro PA, Singh H. (1998). Rheological properties and microstructure of acid milk gels as affected by fat content and heat treatment. *Journal of Food Science*, 63: 660-664.
- Luciano FR, Arntfield SD. (2012). Use of transglutaminases in foods and potential utilization of plants as a transglutaminase source – Review. *Biotemas*, 25: 1-11.
- Mabel MJ. (2012). Microbial transglutaminase: Purification, characterisation and bioactive properties. PhD Thesis, University of Mysore, Karnataka, India.
- Macedo IQ, Faro CJ, Pires EV. (1993). Specificity and kinetics of the milk-clotting enzyme from cardoon (*Cynara cardunculus* L.) toward bovine κ -casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 1537-1540.
- Macedo IQ, Faro CJ, Pires EV. (1996). Caseinolytic specificity of cardosin, an aspartic protease from the cardoon *Cynara cardunculus* L.: action on bovine α_s - and β -casein and comparison with chymosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 42-47.
- Mahmood WA, Sebo NH. (2009). Effect of microbial transglutaminase treatment on soft cheese properties. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 37: 1-9.
- Mariniello L, Pierro P di, Giosafatto CVL, Sorrentino A, Porta R. (2008). Transglutaminase in food biotechnology. En: R Porta, L Mariniello, P. di Pierro (Eds.). *Recent Developments in Food Biotechnology. Enzymes as Additives or Processing Aids*. Research Signpost, Trivandrum, Kerala. Pp: 185-211.

- Marshall RJ. (1982). An improved method for measurement of the syneresis of curd formed by rennet action on milk. *Journal of Dairy Research*, 49: 329-336.
- Marshall RJ. (1990). Composition, structure, rheological properties, and sensory texture of processed cheese analogues. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50: 237-252.
- Martínez F, Labuza TP. (1968). Rate of deterioration of freeze-dried salmon as a function of relative humidity. *Journal of Food Science*, 33: 241-247.
- Martins IM, Matos M, Costa R, Silva F, Pascoal A, Estevinho LM, Choupina AB. (2014). Transglutaminases: recent achievements and new sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98: 6957-6964.
- Marwaha SS, Kennedy JF. (1988). Whey-pollution problem and potential utilization. *International Journal of Food Science + Technology*, 23: 323-336.
- Masotti F, Cattaneo S, Stuknytė M, De Noni I. (2017). Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 64: 102-114.
- Mateo MJ, Everard CD, Fagan CC, O'Donnell CP, Castillo M, Payne FA, O'Callaghan DJ. (2009). Effect of milk fat concentration and gel firmness on syneresis during curd stirring in cheese-making. *International Dairy Journal*, 19: 264-268.
- Mateva N, Srbínovska S, Nikola P, Eftimova E. (2013). Factors affecting the syneresis and coagulation in ultra-filtered cheese. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 3: 48-53.
- Matheis G, Whitaker JR. (1987). A review: Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods. *Journal of Food Biochemistry*, 11: 309-327.
- Matsumura Y, Lee DS, Mori T. (2000). Molecular weight distributions of α -lactalbumin polymers formed by mammalian and microbial transglutaminases. *Food Hydrocolloids*, 14: 49-59.
- Mazuknaite I, Guyot C, Leskauskaite D., Kulozik U. (2013). Influence of transglutaminase on the physical and chemical properties of acid milk gel and cottage type cheese. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11: 119-124.
- McKenzie HA, Sawyer WH. (1967). Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature*, 214: 1101-1104.
- McSweeney PLH. (2007). Cheese yield. En: *Cheese Problems Solved*. PLH McSweeney (Ed.). Woodhead Publishing Limited. Published by Woodhead Publishing Limited. Pp: 100-114.
- McSweeney PLH, Ottogalli G, Fox PF. (2017). Chapter 31 - Diversity and classification of cheese varieties: an overview. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4ª edición)*. P McSweeney, PF Fox, PD Cotter, DW Everett (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 781-808.
- Mercier J-C, Brignon G, Ribadeau-dumas B. (1973). Structure primaire de la caséine κ B bovine. *FEBS Journal*, 35: 222-235.
- Metwally MME, El-Zeini HM, Gazar EF. (2018). Impact of using transglutaminase enzyme in manufacturing low and high fat Mozzarella cheese. *Journal of Food, Nutrition and Population Health*, 2: 1-7.
- Mistry VV, Hassan HN. (1991). Delactosed, high milk protein powder. 1. Manufacture and composition. *Journal of Dairy Science*, 74: 1163-1169.
- Mistry VV, Maubois JL. (2004). Chapter 27 - Application of Membrane Separation Technology to Cheese Production. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4ª Ed.)*. PLH McSweeney PF Fox, PD Cotter, DW Everett (Eds.). Elsevier Academic Press, Cambridge, EUA. Pp: 677-697.
- Mleko S, Gustaw W, Glibowski P, Pielecki J. (2004). Stress relaxation study of UF-milk cheese with transglutaminase. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 32: 237-244.
- Mohanty AK, Mukhopadhyay UK, Grover S, Batish VK. (1999). Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 17: 205-217.
- Moon J-H, Hong Y-H, Huppertz T, Fox PF, Kelly AL. (2009). Properties of casein micelles cross-linked by transglutaminase. *International Journal of Dairy Technology*, 62: 27-32.

- Moreno V, Carballo J, Borderías AJ. (2010). Use of microbial transglutaminase and sodium alginate in the preparation of restructured fish models using cold gelation: Effect of frozen storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11: 394-400.
- Motoki M, Seguro K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 204-210.
- Motta-Correa YO, Mosquera MWJ. (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *@Limentech Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13: 81-91.
- Müller-Buschbaum P, Gebhardt R, Roth SV, Metwalli E, Doster W. (2007). Effect of calcium concentration on the structure of casein micelles in thin films. *Biophysical Journal*, 93: 960-968.
- Mulsow BB, Jaros D, Rohm H. (2007). Chapter 8: Processed Cheese and Cheese Analogues. En: *Structure of Dairy Products*. A Tamime (Ed.). Blackwell Publishing Ltd. Oxford, Reino Unido. Pp: 210-235.
- Muszbek L, Bereczky, Bagoly, Komáromi I, Katona É. (2011). Factor XIII: a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiological Reviews*, 91: 931-972.
- Naciones Unidas. (2015a). 17 Objetivos para transformar nuestro mundo. Disponible en: <http://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-consumption-production/>. Fecha de última consulta: 24 de julio de 2018.
- Naciones Unidas (2015b). World Population Prospects: The 2015 Revision, Key Findings and Advance Tables. Working Paper No. ESA/P/WP. 241. Disponible en: https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf. Fecha de última consulta: 5 de noviembre de 2017
- Nelson BK, Barbano DM. (2005). A microfiltration process to maximize removal of serum proteins from skim milk before cheese making. *Journal of Dairy Science*, 88: 1891-1900.
- Nemes Z, Marekov LN, Fésüs L, Steinert PM. (1999). A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 96: 8402-8407.
- Neve VH, Lorenzen PC, Mautner A, Schlimme E, Heller KJ. (2001). Effects of transglutaminase treatment on the production of set skim milk yoghurt: Microbiological aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 53: 347-361.
- Noguchi K, Ishikawa K, Yokoyama K, Ohtsuka T, Nio N, Suzuki E. (2001). Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 12055-12059.
- Novák P, Havlíček V. (2016). Protein extraction and precipitation. En: *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry (2ª Edición)*. P Ciborowski, J Silberring (Eds). Elsevier, Cambridge, EUA. Pp: 51-62.
- O'Callaghan DJ, O'Donnell CP, Payne FA. (2000). On-line sensing techniques for coagulum setting in renneted milks. *Journal of Food Engineering*, 43: 155-165.
- O'Connell JE, Fox PF. (2000). The two-stage coagulation of milk proteins in the minimum of the heat coagulation time-pH profile of milk: Effect of casein micelle size. *Journal of Dairy Science*, 83: 378-386.
- O'Connell JE, Kruif CGK. (2003). β -Casein micelles; cross-linking with transglutaminase. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects*, 216: 75-81
- Ohtsuka T, Sawa A, Kawabata R, Nio N, Motoki M. (2000). Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48: 6230-6233.
- O'Mahony JA, Fox PF. (2013). Milk proteins: Introduction and historical aspects. En: *Advanced Dairy Chemistry, Volume 1A: Proteins: Basic Aspects (4ª edición)*. PLH McSweeney, PF Fox (Eds.). Springer Science+Business Media, Nueva York, EUA. Pp: 43-85.

- O'Mahony JA, Mcsweeney PLH, Lucey JA. (2009). Rheological properties of rennet-induced skim milk gels made from milk protein concentrate solutions with different ratios of α_s - β -casein. *Milchwissenschaft*, 64: 135-138.
- Ong L, Henriksson A, Shah NP. (2006). Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium spp.* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International Dairy Journal*, 16: 446-456.
- O'Regan J, Ennis MP, Mulvihill DM. (2009). Chapter 13 - Milk Proteins. En: Handbook of Hydrocolloids (2ª Ed.) GO Phillips, PA Williams (Eds.). Woodhead Publishing in Food Science, Technology and Nutrition. Cambridge, Reino Unido. Pp: 298-358.
- O'Sullivan MM, Kelly AL, Fox PF. (2002). Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 69: 433-442.
- Ozer B, Guyot C, Kulozik U. (2012). Simultaneous use of transglutaminase and rennet in milk coagulation: Effect of initial milk pH and renneting temperature. *International Dairy Journal*, 24: 1-7.
- Ozer B, Hayaloglu AA, Yaman H, Gürsoy A, Şener L. (2013). Simultaneous use of transglutaminase and rennet in white-brined cheese production. *International Dairy Journal*, 33: 129-134.
- Ozer B, Kirmaci HA, Oztekin S, Hayaloglu A, Atamer M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yoghurt production. *International Dairy Journal*, 17: 199-207.
- Pagani C. (2015). Uso de TG (transglutaminasa) en yogures y quesos. Sexto congreso Internacional de Lechería de AUTEL. Montevideo, Uruguay. 14-15 de Julio, Colonia de Sacramento.
- Palafox Carlos H, García Carreño F. (2007). Transglutaminasas: de Importante Papel Fisiológico en los Seres Vivos al Desarrollo Novedoso de Tecnología de Alimentos. *BioTecnología*, 10: 21-27.
- Panthi RR, Jordan KN, Kelly AL, Sheehan JJD. Chapter 2 - Selection and Treatment of Milk for Cheesemaking. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology (4ª Ed.). P McSweeney, P Fox, P Cotter, D Everett (Eds.). Academic Press – Elsevier Ltd. Londres, Reino Unidos. Pp: 23-50.
- Papoff CM, Mauriello R, Pirisi A, Piredda G, Addis M, Chianese L. (2004). Proteolytic activity of animal rennet on ovine casein. *Milchwissenschaft*, 59: 414-417.
- Parameswaran KN, Cheng XF, Chen EC, Velasco PT, Wilson JH, Lorand L. (1997). Hydrolysis of gamma:epsilon isopeptides by cytosolic transglutaminases and by coagulation factor XIIIa. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 10311-10317.
- Pasternack R, Dorsch S, Otterback JT, Robenek IR, Wolf S, Fuchsbauer H-L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. Purification, characterisation and sequence of the zymogen. *European Journal of Biochemistry*, 257: 570-576.
- Payne CT. (2009). Chapter 8. Enzymes. En: Ingredients in Meat Products: Properties, Functionality and Applications. R Tarté (Ed.). Springer. Nueva York, EUA. 173-198.
- Pedersen LC, Yee VC, Bishop PD, Le Trong I, Teller DC, Stenkam RE. (1994). Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Protein Science*, 3: 1131-1135.
- Pereira GV, Antunes LAF, Dos Santos Ferreira da Silva RS. (1992). Development and characterization of a cheese analogue containing aqueous soya extract (soya milk), whey and cow milk. *Arquivo de Biologia y Técnica*, 35: 99-115.
- Pereira CI, Gomes AMP, Malcata FX. (2009). Microstructure of cheese: Processing, technological and microbiological considerations. *Trends in Food Science and Technology*, 20: 213-219.
- pH OSVER Fluids Engineering. (2013). Ultrafiltración para la fabricación de queso. Disponible en: <https://www.portalechero.com/innovaportal/file/4698/1/2-ultrafiltracion-para-fabricacion-de-queso.pdf>. Fecha de última consulta: 16 de septiembre de 2018

- Pietroni V, Di Giorgi S, Paradisi A, Ahvazi B, Candi E, Melino G. (2008). Inactive and highly active, proteolytically processed transglutaminase-5 in epithelial cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 128: 2760-2766.
- Pouliot Y, Boulet M, Paquin P. (1989). Observations on the heat induced salt balance changes in milk. *Journal of Dairy Science*, 56: 193-199.
- Pourmohammadi K, Hashemi SMB, Khaneghah AM, Afshari R, Alami M, Shahedi M, Sadeghimahoonak A. (2017). Quality assessment of wheat bread with microbial transglutaminase supplemented with hull-less barley flour. *Current Nutrition and Food Science*, 13: 182-191.
- Prados F, Pino A, Fernández-Salguero J. (2007). Effect of a powdered vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* in the accelerated ripening of Manchego cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 556-561.
- Prakasan V, Chawla SP, Sharma A. (2015). Effect of Transglutaminase Treatment on functional properties of paneer. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4: 227-238.
- Preetha S, Boopathy R. (1997). Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 573-578.
- Rachel NM, Pelletier JN. (2013). Biotechnological applications of transglutaminases. *Biomolecules*, 3: 870-888.
- Radošević V, Tonković K, Gregurek L, Kos B, Šušković J. (2007). Production of fresh probiotic cheese with addition of transglutaminase. *Mljekarstvo: Journal for Dairy Production and Processing Improvement*, 57: 15-29.
- Ramakrishnan TV, Francis FJ. (1979). Stability of carotenoids in model aqueous systems. *Journal of Food Quality*, 2: 177-189.
- Ramanujam MV, Hageman JH. (1990). Intracellular transglutaminase (EC 2.3.2.13) in a procaryote: evidence from vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. 168. *The FASEB Journal*, 4: A2321.
- Ramírez-López C, Vélez-Ruiz JF. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6-2: 131-148.
- Rafiq S, Huma N, Pasha I, Sameen A, Mukhtar O, Kha MI. (2016). Chemical composition, nitrogen fractions and amino acids profile of milk from different animal species. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 29: 1022-1028.
- Rasmussen LK, Højrup P, Petersen TE. (1992). The multimeric structure and disulfide-bonding pattern of bovine kappa-casein. *European Journal of Biochemistry*, 207: 215-222.
- Rasmussen LK, Højrup P, Petersen TE. (1994). Disulphide arrangement in bovine caseins: localization of intrachain disulphide bridges in monomers of κ - and α_{s2} -casein from bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 61: 485-493.
- Rasmussen LK, Johnsen LB, Tsiara A, Sorensen, ES, Thomsen JK, Nielsen NC, Jakobsen HJ, Petersen TE. (1999). Disulphide-linked caseins and casein micelles. *International Dairy Journal*, 9: 215-218.
- Rehman S-U, Farkye NY, Drake M. (2003). Reduced-fat Cheddar cheese from a mixture of cream and liquid milk protein concentrate. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 94-98.
- Reiss K, Kirchner E, Gijzen M, Zocher G, Löffelhardt B, Nürnberger T, Stehle T, Brunner F. (2011). Structural and phylogenetic analyses of the GP42 transglutaminase from *Phytophthora sojae* reveal an evolutionary relationship between oomycetes and marine *Vibrio* bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 286: 42585-42593.
- Riddell-Lawrence S, Hicks CL. (1989). Effect of curd firmness on stirred curd cheese yield. *Journal of Dairy Science*, 72: 313-321.
- Rodríguez-Nogales JM. (2006). Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cow's milk: A statistical approach. *International Dairy Journal*, 16: 26-32.

- Rosano GL, Ceccarelli EA. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5: 172.
- Rossa PN, Burin VM, Bordignon-Luiz MT. (2012). Effect of microbial transglutaminase on functional and rheological properties of ice cream with different fat contents. *LWT - Food Science and Technology*, 48: 224-230.
- Rossi Márquez G, Di Pierro P, Mariniello L, Esposito M, Giosafatto CVL, Porta R. (2017). Fresh-cut fruit and vegetable coatings by transglutaminase-crosslinked whey protein/pectin edible films. *LWT-Food Science and Technology*, 75: 124-130.
- Ruettimann KW, Ladisch MR. (1987). Casein micelles: Structure, properties and enzymatic coagulation. *Enzyme and Microbiology Technology*, 9: 578-589.
- Ruiz-Herrera J, Iranzo M, Elorza MV, Sentandreu R, Mormeneo S. (1995). Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Archives of Microbiology*, 164: 186-193.
- Rytkönen J. (2006). Effect of heat denaturation on bovine milk β -lactoglobulin on its epithelial transport and allergenicity. Public Dissertation - *Acta Universitatis Ouluensis*. Oulu University Press, Finlandia. Pp: 67.
- Saguer E, Fort N, Parés D, Toldrà M, Carretero C. (2007). Improvement of gelling properties of porcine blood plasma using microbial transglutaminase. *Food Chemistry*, 101: 49-56.
- Sakamoto H, Kumazawa Y, Motoki M. (1994). Strength of protein gels prepared with microbial transglutaminase as related to reaction conditions. *Journal of Food Science*, 59: 866-871.
- Sakurai K, Goto Y. (2006). Dynamics and mechanism of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *Journal of Molecular Biology*, 356: 483-496.
- Salinas-Valdés A, De la Rosa Millán J, Serna-Saldívar SO, Chuck-Hernández C. (2015). Yield and textural characteristics of panela cheeses produced with dairy-vegetable Protein (soybean or peanut) blends supplemented with transglutaminase. *Journal of Food Science*, 80: S2950-S2956.
- Şanlı T, Sezgin E, Deveci O, Şenel E, Benli M. (2011). Effect of using transglutaminase on physical, chemical and sensory properties of set-type yoghurt. *Food Hydrocolloids*, 25: 1477-1481.
- Sano K, Nakanishi K, Nakamura N, Motoki M, Yasueda, H. (1996). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding salmon (*Onchorhynchus keta*) liver transglutaminase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63: 1790-1794.
- Santos M, Torné JM. (2009). Recent patents on transglutaminase production and applications: a brief review. *Recent Patents on Biotechnology*, 3: 166-174.
- Sarghini F, Sorrentino A, Di Pierro P. (2013). An integrated mechanical-enzymatic reverse osmosis treatment of dairy industry wastewater and milk protein recovery as a fat replacer: a closed loop approach. *Journal of Agricultural Engineering*, 44: 283-286.
- Sarkar NK, Clarke DD, Waelsh H. (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 25: 451-452.
- Sawyer L. (2003). β -lactoglobulin. En: *Advanced Dairy Chemistry*. Volume 1. Proteins (3ª edición). Part A&B. PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York, EUA. Pp: 319-386.
- Sayadi A, Khosrowshahi A, Madadlou A. (2012). The effect of transglutaminase on the chemical and textural characteristics and microstructure of low-fat white brined cheese. *Journal of Food Research*, 22: 19-29.
- Sayadi A, Madadlou A, Khosrowshahi A. (2013). Enzymatic cross-linking of whey proteins in low fat Iranian white cheese. *International Dairy Journal*, 29: 88-92.

- Schorsch C, Carrie H, Clark AH, Norton IT. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels. *International Dairy Journal*, 10: 519-528.
- Schulz-Collins D, Senge B. (2004). Acid- and acid/rennet-curd cheeses part A: Quark, cream cheese and related varieties. En: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 2. Major Cheese Groups* (3ª edición). PF Fox, PLH McSweeney TM Cogan, TP Guinee (Eds.). Elsevier Academic Press, Burlington, EUA. Pp: 301-328.
- Serafini-Francassini D, Del Duca S, Beninat S. (1995). Plant transglutaminases. *Phytochemistry*, 40: 355-365.
- Serafini-Fracassini D, Del Duca S, D'Orazi D. (1988). First evidence for polyamine conjugation mediated by an enzymatic activity in plants. *Plant Physiology*, 87: 757-761.
- Shah R, Jana AH, Aparnathi KD, Prajapati PS. (2010). Process standardization for rennet casein based Mozzarella cheese analogue. *Journal of Food Science and Technology*, 47: 574-578.
- Shammet KM, Brown RJ, McMahon DJ. (1992). Proteolytic activity of some milk-clotting enzymes on κ -casein. *Journal of Dairy Science*, 75: 1373-1379.
- Sharma A, Jana AH, Chavan RS. (2012). Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications - A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 518-528.
- Sharma R, Lorenzen PC, Qvist KB. (2001). Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formulation of ϵ -(γ -glutamyl)lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. *International Dairy Journal*, 11: 785-793.
- Shaw M. (1984). Cheese substitutes: threat or opportunity? *Journal of the Society of Dairy Technology*, 37: 27-31.
- Sienkiewicz T, Riedel CL. (1990). *Whey and Whey Utilization: possibility for utilization in agriculture and food stuff* (2ª edición). Th. Mann, Essen, Alemania. Pp: 379.
- Signorini M, Beninati S, Bergamini CM. (1991). Identification of transglutaminase activity in the leaves of silver beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Physiology*, 137: 547-552.
- Singer MA, Hortsch M, Goodman CS, Bentley D. (1992). Annulin, a protein expressed at limb segment boundaries in the grasshopper embryo, is homologous to protein cross-linking transglutaminases. *Developmental Biology*, 154: 143-159.
- Smerdel B, Pollak L, Novotni D, Čukeli N, Benković, Lušić D, Ćurić D. (2012). Improvement of gluten-free bread quality using transglutaminase, various extruded flours and protein isolates. *Journal of Food and Nutrition Research*, 51: 242-253.
- Smith JL, Billings GE, Yada RY. (1991). Chemical modification of amino groups in *Mucor miehei* aspartyl proteinase, porcine pepsin, and chymosin. I. Structure and function. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55: 2009-2016.
- Soltani M, Boran OS, Hayaloglu AA. (2016). Effect of various blends of camel chymosin and microbial rennet (*Rhizomucor miehei*) on microstructure and rheological properties of Iranian UF White cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 68: 724-728.
- Sternberg MZ. (1971). Crystalline milk-clotting protease from *Mucor miehei* and some of its properties. *Journal of Dairy Science*, 54: 159-167.
- Steffen W, Ko FC, Patel J, Lyamichev V, Albert TJ, Benz J, Rudolph MG, Bergmann F, Streidl T, Kratzsch P, Boenitz-Dulat M, Oelschlaegel T, Schraeml M. (2017). Discovery of a microbial transglutaminase enabling highly site-specific labeling of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 292: 15622-15635.
- Strop P. (2014). Versatility of microbial transglutaminase. *Bioconjugate Chemistry*, 25: 855-862.

- Sugino H, Terakawa Y, Yamasaki A, Nakamura K, Higuchi Y, Matsubara J, Kuniyoshi H, Ikegami S. (2002). Molecular characterization of a novel nuclear transglutaminase that is expressed during starfish embryogenesis. *European Journal of Biochemistry*, 269: 1957-1967.
- Sun Y, Liu Z, Li H, Li S, Mo B, Lv J. (2017). Functionality of milk protein concentrate 80 with emulsifying salts and its applications in analogue cheeses. *International Journal of Food Properties*, 20: 2594-2607.
- Suzuki S, Izawa Y, Kobayashi K, Eto Y, Yamanaka S, Kubota K, Yokozeki K. (2000). Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64: 2344-2351.
- Swaigood HE. (1995). Protein and amino acid composition of bovine milk. En: Handbook of Milk Composition. RG Jensen (Ed.). Academic Press, Nueva York, EUA. Pp: 464-468.
- Swaigood H. (2003). Chemistry of the caseins. En: Advanced Dairy Chemistry. Volume 1. Proteins (3ª edición). Part B. PF Fox, PLH McSweeney (Eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers. Nueva York, EUA. Pp: 139-201.
- Takahashi N, Takahashi Y, Putnam FW. (1986). Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolygase, transglutaminase) from human placenta. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 83: 8019-8023.
- Tanford C, Taggart VG. (1961). Ionization-linked changes in protein conformation. II. The N – R transition in β -lactoglobulin. *Journal of the American Chemical Society*, 83: 1634-1638.
- Téllez-Luis SJ, González-Cabriales JJ, Ramírez JA, Vázquez M. (2004). Production of transglutaminase by *Streptovorticillium ladakanum* NRRL-3191 grown on media made from hydrolysates of sorghum straw. *Food Technology and Biotechnology*, 42: 1-4.
- Téllez-Luis SJ, Uresti RM, Ramírez JA, Vázquez M. (2002). Low-salt restructured fish products using microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 953-959.
- Teuber M. (1990). Production of chymosin (EC 3.4.23.4) by microorganisms and its use for cheesemaking. *Bulletin of International Dairy Federation*, 251: 3-15.
- Think USA Dairy. (2017). Concentrado de proteína de leche. Disponible en: <http://www.thinkusadairy.org/es/inicio/productos-lacteos-estadounidenses/proteinas-de-leche/categorias-de-las-proteinas-de-leche/concentrado-de-proteina-de-leche>. Fecha de última consulta: 16 de septiembre de 2018.
- Thomas H, Beck K, Adamczyk M, Aeschlimann P, Langley M, Oita RC, Thiebach L, Hils M, Aeschlimann D. (2013). Transglutaminase 6: a protein associated with central nervous system development and motor function. *Amino Acids*, 44: 161-177.
- Tokunaga F, Muta T, Iwanaga S, Ichinose A, Davie EW, Kuma K, Miyata T. (1993). Limulus hemocyte transglutaminase: cDNA cloning, amino acid sequence, and tissue localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 262-268.
- Tramper J, Poulsen PB. (2000). Enzymes as processing aids and final products. En: Applied Biocatalysis (2ª edición). AJJ Straathof, P Adlercreutz (Eds.). CRC Press – Taylor & Francis Group, Boca Ratón, EUA. Pp: 55-91.
- Tubasha ZA, Al-Delaimy KS. (2003). Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 237-241.
- Unión Europea. (2011). Utilización eficiente de los recursos: un imperativo para las empresas. Disponible en: http://ec.europa.eu/environment/resource_efficiency/documents/factsheet_es.pdf. Fecha de última consulta: 5 de noviembre de 2017.
- Ustunol Z, Zeckzer T. (1996). Relative proteolytic action of milk-clotting enzyme preparations on bovine α -, β - and κ -casein. *Journal of Food Science*, 61: 1136-1138.

- van Dijk HJM, Walstra P. (1986). Syneresis of curd. 2. One-dimensional syneresis of rennet curd in constant conditions. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 40: 3-30.
- Vasbinder AJ, De Kruif CGK. (2003). Casein-whey protein interactions in heated milk: The influence of pH. *International Dairy Journal*, 13: 669-677.
- Vasbinder AJ, Rollema HS, Bot A, De Kruif CGK. (2003). Gelation mechanism of milk as influenced by temperature and pH; studied by the use of transglutaminase cross-linked casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 86: 1556-1563.
- Verdi RJ, Barbano DM, Dellavalle ME, Senyk GF. (1987). Variability in true protein, casein, nonprotein nitrogen, and proteolysis in high and low somatic cell milks. *Journal of Dairy Science*, 70: 230-242.
- Verissimo P, Faro C, Moir AJ, Lin Y, Tang J, Pires E. (1996). Purification, characterization and partial amino acid sequencing of two new aspartic proteinases from fresh flowers of *Cynara cardunculus* L. *European Journal of Biochemistry*, 235: 762-768.
- Villalobos E, Santos M, Talavera D, Rodríguez-Falcón M, Torné JM. (2004). Molecular cloning and characterization of a maize transglutaminase complementary DNA. *Gene*, 336: 93-104.
- Wada F, Nakamura A, Masutani T, Ikura K, Maki M, Hitomi K. (2002). Identification of mammalian-type transglutaminase in *Physarum polycephalum*. Evidence from the cDNA sequence and involvement of GTP in the regulation of transamidating activity. *European Journal of Biochemistry*, 269: 3451-3460.
- Walstra P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 73: 1965-1979.
- Walstra P. (1993). Chapter 5: The syneresis of curd. En: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 1. General Aspects. Fox PF (Ed.). Chapman & Hall, Londres, Reino Unido. Pp: 141-191.
- Walstra P, Jenness R. (1987). Química y Física Lactológica. Ed. Acribia, SA. Zaragoza, España. Pp: 423.
- Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. (2006). Dairy Science and Technology (2ª edición). CRC Press – Taylor Francis Group, Boca Raton, Florida, EUA.
- Wang R, Liang Z, Hall M, Söderhäll K. (2001). A transglutaminase involved in the coagulation system of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. Tissue localisation and cDNA cloning. *Fish Shellfish Immunology*, 11: 623-637.
- West DW. (1986). Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *Journal of Dairy Research*, 53: 333-352.
- Witt D, Stackebrandt E. (1990). Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces Waksman* and *Henrici* 1943, 339^{AL}. *Systematic and Applied Microbiology*, 13: 361-371.
- Wu Y-W, Tsai Y-H. (2006). A rapid transglutaminase assay for high-throughput screening applications. *Journal of Biomolecular Screening*, 11: 836-843.
- Yadav JS, Yan S, Pilli S, Kumar L, Tyagi RD, Surampalli RY. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33: 756-774.
- Yasueda H, Nakanishi K, Kumazawa Y, Nagase K, Motoki M, Matsui H. (1995). Tissue-type transglutaminase from red seabream (*Pagrus major*): Sequence analysis of the cDNA and functional expression in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*, 232: 411-419.
- Yee J-J, Hunt C. (2003). Processed cheese with improved firmness using cross-linking enzymes. US Patent: 2003/0165594.
- Yee VC, Pedersen LC, Trong IL, Bishop PD, Stenkamp RE, Teller DC. (1994). Tree-dimensional structure of a transglutaminase: human blood coagulation factor XIII. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 91: 7296-7300.

- Yerlikaya P, Yatmaz HA, Gokoglu N, Ucak I. (2017). The quality alterations of rainbow trout mince treated with transglutaminase. *Food Science and Technology*, 84: 815-820.
- Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 447-454.
- Yuksel Z. (2013). Determination of rennet clotting time by texture analysis method. *Food and Nutrition Sciences*, 4: 1108-1113.
- Yuksel Z, Avci E, Erdem YK. (2011). Modification of the renneting process in Berridge substrate by transglutaminase. *International Journal of Dairy Technology*, 64: 365-371.
- Zhang Y, He S, Simpson BK. (2018). Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. *Current Opinion in Food Science*, 19: 30-35.
- Zhang D, Zhu Y, Chen J. (2013). Microbial transglutaminase production: Understanding the mechanism. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 26: 205-222.
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J. (1995). Microbial transglutaminase – a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44: 277-282.
- Zhu Y, Tramper, J. (2008). Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology*, 26: 559-565.
- Zotzel J, Keller P, Fuchsbauer H-L. (2003a). Transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is activated by an endogenous metalloprotease. *European Journal of Biochemistry*, 270: 3214-3222.
- Zotzel J, Pasternack R, Pelzer C, Ziegert D, Mainusch M, Fuchsbauer H-L. (2003b). Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *European Journal of Biochemistry*, 270: 4149-4155.