



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Ciencia Animal	Departamento:	Nutrición Animal	
Tema estratégico (ANA/PEP):		ANA: Biotecnología. Desarrollo de tecnología para la extracción de biomoléculas, vitaminas naturales, enzimas, cofactores y productos derivados de bioprocesos para el sector agroalimentario. PEP: 4.2 Aprovechar la biotecnología con base en rigurosos análisis científicos, cuidando nuestra riqueza genética, la salud humana y el medio ambiente. 5.1 Coadyuvar a la alimentación y nutrición de la población mexicana, particularmente aquellos en extrema pobreza o con carencia alimentaria severa. Metas de producción: carne de bovino, porcino y ave.				
Línea de investigación:		Producción Agropecuaria				
Título del proyecto: Utilización de residuos cárnicos en la producción de transglutaminasa						
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)		75,000		El proyecto es:	Nuevo <input type="checkbox"/> Continuasión <input checked="" type="checkbox"/>	
Tipo de investigación:		Básica <input type="checkbox"/>	Aplicada <input type="checkbox"/>	Tecnológica <input checked="" type="checkbox"/>	X e-mail del responsable: aguilera_carbo@yahoo.com	
Vinculación:		Si <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>	Fondos concurrentes: En especie y consumibles			
Cooperante(s): UA de C, Centro de Innovación y desarrollo Tecnológico grupo Bafar, UACH.						
Entidad (es):		Coahuila, Chihuahua, Michoacán		Municipio (s): Saltillo, Chihuahua, La Piedad		
Localidades: Saltillo, Chihuahua, La Piedad						
A realizar durante el(los) año(s):		Tres años				
Participantes				Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma
Responsable		Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó		3623	3497	
Colaborador:		Dr. Miguel Mellado Bosque		3623	852	
Colaborador:		Dr. Xochitl Ruelas Chacón			3113	
Colaborador:		MC. Laura Olivia Fuentes Lara		3623	268	
Colaborador:		Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés		Externo	UA de C	
Colaborador:		Dra. Virginia Nevárez Morillón		Externo	UACH	
Colaborador:		Dra. Daniela Sánchez Aldana Villaurel		Externo	CIDTGB	
				Grado por obtener	Matrícula	Firma
Tesista:		Mary Cruz Victorino Jasso		Doctorado	41081308	
Programa Docente:		Doctorado en Ciencias en Producción Agropecuaria				
Tesista:		Por confirmar		Licenciatura		
Programa Docente:		ICTA/Zootecnia				
Vo. Bo.				Autoriza		
Firma y sello						
Nombre		Dr. José Eduardo García Martínez Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Presupuesto solicitado:

Utilización de residuos cárnicos en la producción de transglutaminasa

\$75,000

2.- Introducción

La transglutaminasa es una enzima extracelular de la clase de las transferasas y es producida por la fermentación del microorganismo *Streptovercillium moboarense*, las reacciones producidas por esta enzima producen cambios en las proteínas alimentarias mejorando la textura y la estabilidad en términos de temperatura, sinéresis, propiedades emulsionantes, gelificación y aumento de la capacidad de fijación de agua sin alterar el pH, color, sabor o nutrición mejorando la calidad de los alimentos haciendo posible que sea nutritiva por la adición de aminoácidos esenciales. (Ajinomoto, 2013); (Ahmed et al., 2009); (Ando et al., 1989); (Damodaran & Agyare, 2013); (Kuraishi et al., 2001), (Zhu, et al., 1995). En este contexto investigadores de la industria alimentaria se han dado a la búsqueda de productos que pueden alterar las propiedades tecnológicas y funcionales de las macromoléculas alimentarias, sin que afecte la calidad sensorial y nutricional de los productos (Dube, et al., 2007); (Min & Green, 2008), una opción es la producción de enzimas a base de residuos de alimentos a costos más bajos ya que la producción de estas representa el 28% del costo de la operación dedicado a la adquisición de materia prima. (Klein, et al., 2012)

Los desperdicios de alimentos, que tienen un alto contenido nutricional, se contaminan con la acumulación de estos mismos, facilitando el hábitat perfecto de reproducción de organismos patógenos. Esto genera graves problemas ambientales (Ravindran et al., 2012). Las industrias de carne entre otras, son la mayor fuente de residuos de la industria alimentaria animal, estos desechos contienen cantidades elevadas de proteínas y no pueden ser evacuados sin un tratamiento apropiado (Jayathilakan et al., 2012). Estudios han reportado la el uso de proteínas alimenticias como sustratos para la transglutaminasa tales como suero de leche, globulinas de soya, proteínas miofibrilares, albúminas entre otros (Bönisch et al., 2007; Bönish et al., 2006; Hong & Xiong, 2012.) En base a lo anterior el presente trabajo pretende la producción de la enzima transglutaminasa a partir de residuos de la industria cárnica.

Objetivos

Objetivo general

Producir la enzima transglutaminasa a partir de residuos cárnicos

Objetivos específicos

- Caracterización química del residuo (análisis fisicoquímico)
- Evaluar el proceso de pretratamiento del residuo.
- Caracterización del residuo pretratado.
- Evaluar el proceso de producción de la enzima transglutaminasa (estandarización del proceso).
-

Hipótesis

Los residuos cárnicos en sus diferentes etapas de procesamiento y empaque serán utilizados como sustrato para la bacteria *Streptovercillium moboarense* que a su vez contribuya a la producción de la enzima transglutaminasa.

3.-Revisión de Literatura

La transglutaminasa es una enzima que cataliza las reacciones de entrecruzamiento de los grupos γ -carboxiamida de los residuos de glutamina y los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, es producida por la fermentación de el microorganismo *Streptovercillium moboarense*, actúa en amplios intervalos de pH de 5,0 a 8,0 con una temperatura óptima de 50 °C, es independiente de Ca^{2+} , y su activación no requiere cofactores especiales, estas características hacen de la transglutaminasa una enzima atractiva para la industria alimentaria (Macedo & Sato, 2005; Motoki y Seguro, 1998; Yokoyama et al., 2004; Zhu et al., 1995; Nonaka et al., 1989).

Usos de la transglutaminasa en la Industria Alimentaria

Aplicación en cárnicos

Su principal función es en la reestructuración de productos cárnicos a través de los enlaces cruzados que promueve, es decir Los enlaces cruzados que se forman por la acción de la TGasa, fortalecen la estructura de la red de proteínas en los productos carnicos preparados, como salchichas y jamon, y dando como resultado que las características físicas como la elasticidad y la firmeza sean mejores (Gaspar et al., 2015; Kurashi et al., 2001).

Aplicación en lácteos

La enzima se ha utilizado en la producción de yogur, evitando así la sinéresis (separación del suero) ya que aumenta la capacidad de retención de agua del gel, se ha utilizado en la producción de queso a partir de proteínas de suero de leche (Soeda, 2000) o en leche entera (Kuraishi et al, 1997). El uso de esta enzima en la industria lactea incluye la estabilización de productos como nata batida y la preparación de caseinato con enlaces cruzados como ingredientes funcionales (Lorenzen et al., 1998).

Aplicación en pescado

El uso potencial de la transglutaminasa para mejorar las propiedades mecánicas de los productos reestructurados proviene de la industria del surimi (Catro et al., 2009), también los cambios en la textura de productos reestructurados y alimentos congelados se pueden prevenir con la adición de una solución de transglutaminasa y caseinato. (Sakai et al., 1996; Aguilar et al., 2012).

La transglutaminasa es una enzima con un amplio potencial para su aplicación en la industria de alimentos, su producción puede realizarse mediante un proceso de fermentación, utilizando cualquier tipo sustrato, sin embargo el costo de producción es elevado, por ello se buscan fuentes de carbonos que sean de bajo costo y que provengan de desechos de la industria de procesos alimentarios. (Aguilar et al., 2012)

Producción de enzimas a partir de residuos de la industria alimentaria

Los residuos de la industria alimentaria han favorecido en la producción de enzimas de uso comercial,enzimas oxidativas como la celulasa, la lacasa, la amilasa, la xilanas, la fitasa, y la lipasa han sido el foco de la producción de residuos de residuos de alimentos orgánicos. Las cepas microbianas son capaces de degradar los polímeros complejos en la biomasa vegetal y utilizar los azúcares liberados para su sustrato este hecho es aprovechado al utilizar los residuos de la industria de procesamiento de alimentos como materia prima para la producción de enzimas. (Stamatakis, 2010; Narra et al., 2012; Ho, 2015; Zhou et al., 2014; Kiran et al., 2014; Viniestra et al., 2003).

La transglutaminasa es un enzima de gran importancia en la industria de alimentos, su producción se lleva a cabo mediante un proceso de fermentación, sin embargo los costos de producción son elevados por lo que es importante la

búsqueda de nuevas fuentes de carbono, principalmente las obtenidas a partir de residuos industriales para la producción de la misma.

4.- Procedimiento Experimental

ETAPA 1

Caracterización química del residuo y agua de cocción (análisis fisicoquímico)

A la materia prima se le determinará el contenido de humedad, proteínas y lípidos por los métodos establecidos en el Manual de Técnicas Oficiales A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist), 1990. Además se determinará Densidad y Porosidad en el caso del empaque.

Materia seca

Se determinará en una termobalanza (Ohaus MB23) a 120°C con un peso mínimo de muestra de 0.5 gramos.

Lípidos

La determinación de lípidos se llevará a cabo utilizando un equipo de extracción Soxhlet, colocando en el sifón 5 g de materia prima, la extracción se realizará por 4 horas con hexano como agente extractivo.

Proteína cruda (Nx 6.25)

El método de Macro-Kjeldhal: se coloca 1 g de muestra en digestión con ácido sulfúrico concentrado y 5 g de catalizador mezcla reactiva de selenio. Al resultado de la digestión se le agregaran 300 mL de agua destilada, se deja enfriar a temperatura ambiente, colocar en matraz Kjeldhal que contenga 50 mL de ácido bórico 4% v/v, seis gotas de indicador mixto (rojo de metilo 0.2% y verde de bromocresol 0.2%), 110 mL de hidróxido de sodio 45% (p/v) y seis granallas de zinc. Se tomaran 250 mL del destilado para llevar a cabo una titulación con ácido sulfúrico hasta el vire de color azul a rojo. El contenido total de proteína se cuantificará utilizando el factor de conversión de 6.25 empleando la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(\text{mL gastados de la muestra} - \text{mL del blanco}) (\text{normalidad del ácido})(0.014)(100)}{\text{g de muestra}}$$

$$\% \text{ de Proteína} = (\%N) (\text{Factor de conversión})$$

ETAPA 2

Evaluar el proceso de tratamiento de los residuos

En un vaso de precipitado de 1 lt colocar dentro del autoclave 0.5 Lt del agua de cocción y 0.5 kg del empaque relación 1:1 masa-volumen, se llevará a cabo en autoclave a una temperatura de 120 °C y 15 PSI de presión con diferentes tratamientos (ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico e hidróxido), después se llevará a cabo la cinética enzimática con la cual se espera conocer el punto máximo de la liberación del sustrato y saber cual de las soluciones es la mejor para obtener el sustrato de la fermentación. Las variables serán las siguientes ph, temperatura, tiempo, nivel de inóculo, concentración de sustrato, concentración de sales como cloruro de magnesio, fosfato, nitratos que ayudan como cofactores y estos nos dirá a que nivel cada una de ellas tiene ingerencia en la producción.

ETAPA 3

FERMENTACIÓN

El medio de cultivo para la producción de transglutaminasa es una fermentación aeróbica, siendo la aireación y la agitación necesarias, la temperatura óptima varía de 25°C a 35°C, el tiempo de fermentación depende de las condiciones del cultivo y es determinada por la mayor actividad que puede lograrse de 2 a 4 días. La transglutaminasa es estable un pH óptimo de 5 a 8. (Aguilar et al., 2012; Zhu et al., 1995; Méndez et al., 2006; Ando et al., 1989)

Producción preliminar de la enzima bajo condiciones estándar (reportadas en la literatura)

Proceso de fermentación

Se realizarán las fermentaciones bajo las siguientes condiciones:

Para este proceso se utilizó un medio que contenía los siguientes reactivos (cuadro 2):

Cuadro 2. Composición del medio de fermentación

Nutriente	Concentración g/L
Fosfato de sodio dibásico	5
Fosfato de potasio monobásico	2
Sulfato de Mg heptahidratado	0.5
Peptona	10.5
Extracto de levadura	2.5
Caseinato de sodio	38.4
Glicerol, almidón y glucosa	30

Una vez preparada la mezcla, se tomaron de la misma 100 ml y se colocaron en matraces de 250 ml y se le agregaron 44 µl del inóculo de *Streptovercillium ladakanum* que se reactivara con anterioridad. Se prepararan tres matraces de cada sustrato agua de cocción, empaque y glicerol (control) se tomaran muestras de 1000 µl en microtubos a partir de las 0 horas hasta completar 120 horas, cada 12 horas. El ensayo se llevará a cabo por triplicado a 200, 300 y 400 rpm durante 120 horas en un agitador orbital (shaker), monitoreando cada 12 horas. Con una temperatura de 26 °C y un pH de 7. Una vez que se obtengan todas las muestras se realizaron análisis tales como proteína por la técnica de Lowry, azúcares reductores (DNS) y azúcares totales por el método de fenol sulfúrico, producción de biomasa, consumo de sustrato, actividad enzimática por un método cualitativo y por un método colorimétrico basado en la formación de monohidroxamato a partir de N-α-CBZ-GLN-GLY (Grossowicz,1950).

ETAPA 4

Estandarización del proceso

Encontrar las mejores condiciones para la producción de la enzima se utilizará un diseño experimental Placket-Burman este diseño es una técnica estadística eficaz para demostrar la importancia relativa de los factores estudiados y predecir sus valores óptimos (Hassan et al., 2016) las variables serán las siguientes ph, temperatura, tiempo, nivel de inóculo, concentración de sustrato, concentración de sales como cloruro de magnesio, fosfato, nitratos que ayudan como cofactores y estos nos dirá a que nivel cada una de ellas tiene ingerencia en la producción.

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Caracterización del residuo	X	X										
Evaluar procesos de pretratamiento de residuos			X	X								
Caracterización del residuo pre-tratado					X	X						
Estandarización del proceso de propagación del microorganismo							X	X				
Selección del mejor residuo para la producción de la enzima									X	X		
Redacción de avance y artículo científico							X	X	X	X	X	X

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Caracterización del residuo		X	X									
Evaluar procesos de pretratamiento de residuos		X	X									
Caracterización del residuo pre-tratado			X	X								
Estandarización del proceso de propagación del microorganismo			X	X								
Selección del mejor residuo para la producción de la enzima				X	X							

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2018	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

- Avance tesis de Doctorado y Licenciatura
- 1 artículo científico enviado
- Estrategia para la producción de la enzima
- Divulgación en Congreso Internacional

6.-Literatura Citada

Aguilar-Zárate, P., Aguilar-Zárate, M., Inungaray, M. L. C., & Rivera, O. M. P. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica*, 4(8)

Ahmed, A. M., Kuroda, R., Kawahara, S., Ohta, K., Nakade, K., Aoki, T., & Muguruma, M. (2009). Dependence of microbial transglutaminase on meat type in myofibrillar proteins cross-linking. *Food Chemistry*, 112(2), 354-361.

Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R. 1989. Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2613-2617.

Ajinomoto_ (2013). Ajinomoto Foods Europe SAS. Germany. Disponible en: <<http://transglutaminase.com>>. Acceso em: 06 feb. 2013.

Bönisch, M. P., Huss, M., Weigl, K., & Kulozik, U. (2007). Transglutaminase crosslinking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *International Dairy Journal*, 17(11), 1360-1371.

Bönisch, M. P., Tolkach, A., & Kulozik, U. (2006). Inactivation of an indigenous transglutaminase inhibitor in milk serum by means of UHT-treatment and membrane separation techniques. *International Dairy Journal*, 16(6), 669-678.

Castro-Briones, M., Calderón, G. N., Velazquez, G., Rubio, M. S., Vázquez, M., & Ramírez, J. A. (2009). Mechanical and functional properties of beef products obtained using microbial transglutaminase with treatments of pre-heating followed by cold binding. *Meat science*, 83(2), 229-238.

Damodaran, S., & Agyare, K. K. (2013). Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 12-18.

Dube, M., Schäfer, C., Neidhart, S., & Carle, R. (2007). Texturisation and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase. *European Food Research and Technology*, 225(2), 287-299.

Gaspar, A. L. C., & de Góes-Favoni, S. P. (2015). Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food chemistry*, 171, 315-322.

Hassan, M., Essam, T., Yassin, A. S., & Salama, A. (2016). Optimization of rhamnolipid production by biodegrading bacterial isolates using Plackett-Burman design. *International journal of biological macromolecules*, 82, 573-579.

- Ho, H. (2015). Xylanase production by *Bacillus subtilis* using carbon source of inexpensive agricultural wastes in two different approaches of submerged fermentation (SmF) and solid state fermentation (SsF). *Journal of Food Processing and Technology*, 6(4).
- Hong, G. P., & Xiong, Y. L. (2012). Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins. *Meat Science*, 91(1), 36–42.
- Jayathilakan, K. et al. (2012) Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* 49, 278–293.
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskiewicz-Popiel, P., Simmons, B. A., & Blanch, H. W. (2012). The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), 1083-1087
- Kuraishi, C., Yamazaki, K., & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17(2), 221-246.
- Kuraishi C., Sakamoto J. y Soeda T. 1996. The usefulness of Transglutaminase for food processing. Biotechnology for improved foods and flavors. *In: Takeoka GR, Teranishi R, Williams PJ, Kobayashi A (eds) Biotechnology for improved foods and flavors. ACS symposium series 637, 29–38 pp.*
- Lorenzen P. C., Mautner A. y Schlimme E. 1998. Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase. *Nahrung-food*,42(3-4): 151-154.
- Macedo, J., & Sato, H. (2005). Propriedades e aplicações da transglutaminase microbiana em alimentos. *Alimentos e Nutrição*, 16(4), 413–419
- Min, B., & Green, B. W. (2008). Use of microbial transglutaminase and nonmeat proteins to improve functional properties of low NaCl, phosphate-free patties made from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) belly flap meat. *Journal of Food Science*, 73(5), E218–E226.
- Motoki, M., & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 204–210.
- Narra, M., Dixit, G., Divecha, J., Madamwar, D., & Shah, A. R. (2012). Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresource technology*, 121, 355-361.
- Nonaka, M. H. Tanaka, A. Okiyama, M. Motoki, H. Ando, K. Umeda, A. Matsuura. 1989. Polymerization of several proteins by Ca²⁺-independent transglutaminase derived from microorganisms, *Agric. Biol. Chem.*, 53: 2619–2623
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in biotechnology*, 34(1), 58-69.
- Sakai T., Kuraishi C., Sakaguchi S., Susa Y. y Soeda. T. 1996. Pretreating Food Material Having Good Texture by Treating Material with Transglutaminase. Japan Patent 8,332,059.
- Soeda T. 2000. Cheese whey protein having improved texture, process for producing the same and use thereof. Ajinomoto Co. Inc, assignee. European Patent Application (E P 0966887 A1).
- Stamatakis, G. (2010). Energy and geo-environmental applications for olive mill wastes. a review. *Hellenic Journal of Geosciences*, 45(1), 269-282.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., de Jesus Romero-Gomez, S., Diaz-Godinez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 157-167.
- Yokoyama, K., Nio, N., & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(4), 447–454.
- Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, Bol J (1995) Microbial transglutaminase: a review of its production and application in food processing. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:277–282.
- Zhou, J., Yang, T., Mei, Y. Z., Kang, L., & Dai, C. C. (2014). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* B3 cultured with food waste and wheat straw as the main nitrogen and carbon sources. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 64(10), 1154-1163.