

Aplicación de la Enzima Transglutaminasa en Salmón, Reineta y Pulpo

Emir Valencia^{(1)*}, Sergio González⁽²⁾, Roberto Quevedo⁽³⁾ y Marcia Leal⁽¹⁾

Universidad de Los Lagos, Departamento de Acuicultura y Recursos Agroalimentarios, (1) Laboratorio de Investigación Química, Programa FITOGEN, (2) Laboratorio Físicoquímica de Alimentos, (3) Programa Fitogen., Avenida Fuchslocher 1305, Osorno. Chile. (e-mail: evalen@ulagos.cl)

* Autor al que debe ser dirigida la correspondencia

Recibido Ago. 22, 2014; Aceptado Nov. 3, 2014; Versión final recibida Dic. 30, 2014

Resumen

Se evaluó el uso de la enzima transglutaminasa Activa EB en tres especies chilenas de origen marino: salmón, pulpo y reineta. Se utilizó la enzima con el objeto de obtener productos originales y atractivos, sin alteración de sus características organolépticas. Se reestructuró carne de salmón, pulpo y reineta en tripas; unión de filetes de salmón y de reineta; unión de filetes de salmón con su piel; unión de filetes de reineta con su piel; reparación de filetes con problemas de gaping en salmón y unión de reestructurado de salmón en forma de rollos con su piel. Estos productos se evaluaron sensorialmente. Los resultados demostraron que no existe diferencia entre las características organolépticas conocidas versus las que presentan los nuevos productos elaborados con la enzima, entregando valor agregado a productos considerados industrialmente como de descarte. Se entrega información de aplicación en pulpo y reineta, especies sobre las que no hay reportes en literatura.

Palabras clave: enzimas, transglutaminasa, salmón, pulpo, reineta, características organolépticas

Application of Transglutaminase Enzyme in Salmon, Reineta and Octopus

Abstract

The use of the transglutaminase enzyme Activa EB in three Chilean marine species: salmon, octopus and reineta has been studied. In these species the enzyme has been used with the goal of obtaining original and attractive products, without causing alteration in their organoleptic characteristics. The meat of the salmon, octopus and reineta has been restructured in molded forms; joining of salmon and reineta filets; fixing of the salmon filet with gaping problems and joining of restructured salmon in the form of rolls with its skin. Once the products have been obtained sensory analysis was performed. The results show that there is no difference between the organoleptic characteristics that are known for these species and the characteristics presented by the products elaborated with the enzyme, giving the possibility of adding value to products considered in the industry as waste products. The application of transglutaminase in octopus and reineta has not been previously described in the literature before.

Keywords: enzymes, transglutaminase, salmon, octopus, reineta, organoleptic characteristics

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son biocatalizadores complejos de gran especificidad y eficiencia, producidos por las células de organismos vivos, que aumentan la velocidad de las reacciones biológicas a través de vías bien definidas y cuya actividad está sujeta a regulación. Las sustancias sobre las que actúan las enzimas, transformándolas, se denominan sustratos (Schmidt y Pennacchiotti, 1982). Actualmente, más de mil enzimas han sido aisladas y clasificadas de acuerdo con el sustrato específico sobre el cual actúan. Se consideran 6 grupos principales de enzimas de acuerdo al tipo de reacción implicada: *Oxidorreductasas*, *Transferasas*, *Hidrolasas*, *Liasas*, *Isomerasas* y *Ligasas* (Schmidt y Pennacchiotti, 1982). Las enzimas han sido empleadas desde tiempos remotos en la elaboración de alimentos, señalándose en la literatura su uso en la elaboración de quesos, vinos, jugos de frutas, jarabes de hidratos de carbono y cervezas, entre otras (Peña y Quirasco, 2014)

Todo alimento constituye un complejo sistema biológico, cuyas células se encuentran en equilibrio por acción de las enzimas que encierran. En este contexto, los tejidos provenientes de un organismo animal o vegetal, que después de su muerte por matanza, cosecha o preparación, llegan a convertirse en alimentos, contienen todo el conjunto de enzimas que necesitan para su metabolismo, tanto anabólico como catabólico y que persisten después de la destrucción de los tejidos. (Schmidt y Pennacchiotti, 1982). Para comprender los principios y las ventajas de la suplementación de enzimas, es necesario observar estrechamente los factores envueltos: el sustrato, los tipos y acciones de las enzimas y las propiedades que dará este agregado enzimático a los productos finales (Reed, 1966). Se pueden modificar las propiedades de las proteínas mediante procesos físicos o químicos, los cuales permiten la alteración de sus propiedades funcionales. El empleo de enzimas es considerado aceptable por los consumidores, ya que ellas tienen una actividad altamente específica y solamente se usan en procesos catalíticos; por esto, las enzimas presentan menor probabilidad de producir compuestos tóxicos y se consideran más “naturales” que los tratamientos químicos (Gauche et al., 2009; Singh, 1991).

La transglutaminasa (glutaminil-péptido amino γ -glutamyltransferasa) es una enzima de amplia distribución en la naturaleza que se ha encontrado tanto en tejidos animales como vegetales (Jozami y Seselovsky, 2003; Alves et al., 2010). La transglutaminasa pertenece al grupo de enzimas transferasas, cuya característica más relevante es que genera moléculas de gran tamaño a partir de pequeños sustratos proteicos mediante la reacción química de ligazón cruzada. La adición de transglutaminasa contribuye a la prevención de la sinéresis y al incremento del índice de consistencia (Gauche et al., 2009). La enzima transglutaminasa cataliza la reacción de polimerización de proteínas. Variables de esta reacción son la temperatura, la concentración de la enzima y el tiempo. La transglutaminasa puede modificar las proteínas por medio de la incorporación de aminos, ligazón cruzada y deaminación. Como resultado de estas reacciones, se producen polímeros de alto peso molecular, con cambios en las propiedades funcionales de las proteínas, permitiendo la posibilidad de mejorar las propiedades reológicas y sensoriales de productos alimenticios diversos.

El uso de esta enzima comenzó con la manufactura de productos de surimi en Japón, a partir de lo cual la transglutaminasa se ha empleado en el mejoramiento de la textura y en la modificación de propiedades funcionales de alimentos preparados en general, destacándose productos del mar (surimi), farináceos (tallarines) y productos lácteos (yogurt). Con el descubrimiento de la transglutaminasa microbiana, la reacción de enlace cruzado que esta enzima permite, ha sido extensamente investigada con algunas proteínas, tales como caseínas, gluten, globulina y proteínas de soya (Gauche et al., 2008; Kuraishi et al., 2001; Noghani et al., 2014). Debido a que las aplicaciones industriales de las enzimas requieren que éstas sean producidas a gran escala y bajo costo, el empleo de algunas enzimas de origen vegetal y animal ha ido decayendo, a favor de las enzimas de origen microbiano. Se observa en nuestro país un creciente interés por parte de los procesadores de alimentos de crear productos nuevos al menor costo posible, con un aprovechamiento más integral de las materias primas, donde el uso de nuevos ingredientes se ve como la clave para alcanzar dichos propósitos.

En las últimas décadas, los investigadores y las industrias alimentarias han intensificado su búsqueda de métodos y productos que puedan alterar las propiedades tecnológicas y funcionales de las macromoléculas de los alimentos, debido a que la funcionalidad afecta la calidad sensorial y nutricional de los productos (Camolezi y Pedroso, 2015; Dube et al., 2007; Min y Green, 2008). Recientemente se han publicado trabajos usando TGA aplicado a filetes de tilapia (Weng y Zheng, 2015), sardina (Kudre y Benjakul, 2014), cangrejo azul (Martínez et al., 2014), surimi de diferentes pescados (Chanarat et al., 2012), filetes de truchas (Palmeira et al., 2014) entre otros.

El objetivo de este estudio fue evaluar el empleo de la enzima transglutaminasa (TG-EB) en tres especies chilenas de origen marino comercialmente atractivas para el consumidor: salmón (*Salmo salar*), pulpo (*Octopus mimus*) y reineta (*Brama australis*). Considerando el enorme interés de la industria alimentaria en el uso de enzimas, debido a su especificidad y a sus condiciones de reacciones con bajo riesgo de formación de productos tóxicos (Özrenk, 2006), este trabajo se desarrolló reestructurando carne de salmón, pulpo y reineta en tripas; unión de filetes de salmón y de reineta; unión de filetes de salmón con su piel; unión de filetes de reineta con su piel; reparación de filetes con problemas de gaping en salmón y unión de reestructurado de salmón en forma de rollos con su piel. Los productos preparados se evaluaron sensorialmente (Larmond, 1973; Anzaldúa-Morales, 1994).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió a realizar el reestructurado de productos del mar de tres especies marinas: reineta, salmón y pulpo, empleando para tal efecto la enzima Transglutaminasa Activa EB (TG-EB) cuyo fabricante es la empresa japonesa Ajinomoto Co. Inc. Para ejecutar el proceso de reestructurado se empleó materia prima fresca tal como filetes y trozos de reineta, salmón y pulpo, de bajos calibres y que no cumplen parámetros de calidad en una planta de procesos.

Muestras

Muestra de Pulpo para reestructurado en tripas. La materia prima se encontraba cruda y congelada, por lo que se expuso durante 30 minutos al ambiente para su descongelación. Dado que la textura de la carne de pulpo es muy dura se ablandan ocho muestras agregando enzima papaína en diferentes cantidades y la novena es sometida a golpeo manual. El ablandamiento se realiza de dos formas diferentes: las muestras 1, 3, 5 y 7 se sumergieron en soluciones de papaína, en cambio a las muestras 2, 4, 6 y 8 el ablandador se les espolvorea. Todas las muestras se dejaron en proceso de reacción con el ablandador durante 30 minutos. Posteriormente, con el objeto de asegurar el proceso de ablandado, las muestras se llevaron a cocción en una marmita por espacio de 30 minutos, a 100°C. Se midió el porcentaje de pérdida de peso después de la cocción. Una vez cocidas las muestras se dejaron enfriar en recipiente con hielo granizado. A continuación, se procedió a agregar la enzima TG-EB con el método de espolvoreo, y luego a embutir en tripas artificiales de 65 mm de diámetro (Prinafan incolora). La enzima TG-EB se agregó al 1% con respecto al peso final (después de la cocción), de acuerdo al protocolo del fabricante de la enzima. (Larmond, 1973). Por último, las muestras se sometieron a diferentes tiempos de reposo (ver Tabla 1). Las muestras así preparadas se sometieron a un panel no experto de degustación para medir textura y color.

Tabla 1: Preparación de muestras de pulpo.

Muestra	Masa de papaína (g)	Volumen de agua adicionada (L)	Tiempo de reposo con la enzima TG-EB (min)
1	1.0	2.0	45
2	1.0	0.0	60
3	2.5	2.0	90
4	2.5	0.0	120
5	5.0	2.0	120
6	5.0	0.0	60
7	10.0	2.0	90
8	10.0	0.0	45
9	0.0	0.0	75

Muestra de Reineta para reestructurado en tripas. La materia prima se encontraba cruda, congelada y en trozos, por lo que se expuso durante 30 minutos al ambiente para su descongelación. A las muestras se les agrega la enzima TG-EB con el método de espolvoreo; se mezcla en forma manual y mecánica hasta obtener una masa disgregada y luego se procede a embutir en tripas artificiales de 65 mm de diámetro (Prinafan incolora). La enzima TG-EB se agregó al 1% con respecto al peso de la muestra, de acuerdo al protocolo del fabricante de la enzima. (Larmond, 1973). Posteriormente las muestras se dejaron en reposo a temperatura ambiente por un periodo de 1 a 2 horas. Las muestras así preparadas se congelaron y almacenaron para el posterior análisis sensorial.

Muestra para unión de filetes y unión de filetes con piel. Para ambos productos se utilizó materia prima cruda siguiéndose el siguiente procedimiento: se humedecen los filetes, se adiciona la enzima TG-EB al 1% con respecto al peso de la muestra; se unen los filetes y se ejerce presión sobre ellos. A continuación se

dejan reposar a temperatura ambiente durante un periodo de una a dos horas; luego se congelan y almacenan para el posterior análisis sensorial. El mismo procedimiento se realiza para la unión de filetes con piel de reineta.

Muestra de Salmón para reestructurado en tripas. Para este proceso se sigue el mismo procedimiento descrito para el reestructurado en tripas para reineta.

Muestra para unión de filetes y unión de filetes con piel. Para este proceso se sigue el mismo procedimiento descrito para la unión de filetes de reineta.

Reparación de filetes con problemas de gaping. El procedimiento a emplear con este tipo de materia prima es el mismo que se describe para la unión de filetes de reineta.

Unión de reestructurado con piel con forma de tripas. Se emplean filetes reestructurados (ver procedimiento para unión de filetes). Se espolvorea la enzima TG-EB sobre dichos filetes, se enrollan en forma tubular, luego se congelan, después se descongelan y se procede a pegar la piel de salmón sobre el rollo. Las muestras preparadas se vuelven a congelar y se almacenan para el posterior análisis sensorial.

Análisis sensorial

Todas las muestras que se presentan al panel de evaluación sensorial se someten previamente a cocción en placa calefactora (cocción a la plancha). Estas pruebas son sensoriales y discriminativas, para las cuales no se requiere conocer la sensación subjetiva que produce un alimento a una persona, sino que se desea establecer si hay diferencias o no entre dos o más muestras y, en algunos casos, la magnitud o importancia de esa diferencia. A través de ella, se busca determinar el efecto de modificaciones en las condiciones del proceso sobre la calidad sensorial del producto, las alteraciones introducidas por la sustitución de un ingrediente por otro y en este caso, saber si los jueces podrían determinar la presencia o no de la enzima TG-EB en los productos evaluados. Se utilizó la prueba de comparación apareada simple, pidiéndole a cada juez que compare en cuanto a diferencia o no de sabor respecto de un sabor conocido "de memoria", en este caso, reineta y salmón sin aditivo enzimático y que registre los resultados en una hoja de prueba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pulpo reestructurado en tripas. En el proceso previo de cocción para ablandar la materia prima se obtuvo en promedio una pérdida de peso de un 53.7%, cifra importante a tomar en consideración para el balance de materia en la preparación industrial.

En las pruebas de degustación, se solicitó a un panel semientrenado de 15 jueces que midiera textura y que la califique en blanda (B), chiclosa (C) y dura (D), y que además, midiera color bajo los conceptos de morado (M), blanco (B) y morado pálido (MP). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Resultados del panel de degustación para pulpo reestructurado en tripas.

Muestra N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Observación (textura/color)	C/B	B/MP	B/MP	B/MP	B/M	B/MP	B/M	C,D/MP	B,C/M

De acuerdo a estos resultados, se debiera escoger el procedimiento realizado para elaborar las muestras N° 5 y 7, debido a que fueron las únicas en que su textura fue calificada como blanda y su color como morado. es decir, no se modifica el color característico de la materia prima y de textura aceptable para su consumo.

Reineta reestructurada en tripas. Unión de filetes y unión de filetes con piel. Con estos procesos aplicados a reineta se buscó: volver a pegar la piel de la reineta al músculo, poder unir trozos de filete, de manera de poder utilizar aquellas partes del filete que son descartadas luego de la elaboración de otros productos, y reestructurado en tripas. Los resultados de la prueba sensorial aplicada al producto reestructurado en tripas con cocción en plancha frente a un panel de 15 jueces semientrenados. Los resultados de esta prueba indican que 9 jueces no advierten diferencia entre el producto con enzima y sin enzima, los seis restantes sí notan diferencia.

Según estos datos, y considerando la tabla de significancia para pruebas de dos muestras (Roessler et al., 1956), para “pruebas de una cola” con una probabilidad de 5%, no existen diferencias significativas entre las muestras, lo que indica que el ingrediente incorporado en el músculo de la reineta no produce alteración de sabor. De acuerdo al test aplicado, para que existiera diferencia 12 jueces tendrían que encontrar alguna diferencia.

Salmón: Todos los procesos aplicados a salmón buscaron los mismos objetivos que para el caso de reineta, presentado anteriormente. Los resultados de la prueba sensorial aplicada al producto reestructurado en tripas con cocción en plancha frente a un panel de 15 jueces semi-entrenados, indican que 11 jueces no advierten diferencia entre el producto con enzima y sin enzima, los cuatro restantes sí notan diferencia. Según estos datos, y de igual forma que en el caso anterior, no existen diferencias significativas entre las muestras, lo que indica que el ingrediente incorporado en el músculo del salmón no produce alteración de sabor. De acuerdo al test aplicado, para que existiera diferencia 12 jueces tendrían que encontrar alguna diferencia.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, podemos indicar que el empleo de la transglutaminasa en la producción de carne reestructurada de pescados y moluscos permite obtener productos de buen sabor, color y textura a partir de la unión de pequeños trozos de carne entre sí, lo cual significa transformar desechos en productos de calidad.

El empleo de la enzima transglutaminasa permite para el caso de la reineta y del salmón elaborar diversos tipos de productos, ampliando la gama de oferta en productos de alto valor agregado dirigido a un mercado de consumidores cada día más exigentes, permitiendo obtener productos innovadores y atractivos a partir de piezas de menor valor, quedando así demostrado el principal uso de la enzima que, según la literatura, es la de mejorar la textura y la apariencia en productos pesqueros,

Los procesadores de alimentos constantemente tratan de crear productos exitosos al menor costo posible, donde el uso de ingredientes innovadores es la clave para alcanzar dicho objetivo. Previo a este trabajo no existía información sobre el uso de la enzima en pulpo y reineta, quedando demostrado que su utilización en estas dos especies permite obtener nuevos productos de calidad

En relación al precio de la transglutaminasa, éste puede ser considerado elevado (US\$83/kg), no obstante los costos asociados a la elaboración de nuevos productos no se incrementan dramáticamente, toda vez que la dosis a adicionar es baja (1%).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo y colaboración de la Dirección de Investigación de la Universidad de Los Lagos y a la Sra. Soledad Bengoa y al Sr. René Manríquez de la Empresa Prinal S.A. de Santiago.

REFERENCIAS

Alves, J., L. Durães Sette y H. Harumi Sato, *A Comparative Biochemical Characterization of Microbial Transglutaminases: Commercial vs. a Newly Isolated Enzyme from Streptomyces Sp.*, Food Bioprocess Technol, 3:308–314 (2010)

Anzaldúa-Morales, A., *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España. (1994)

Camolezi, A.L. y S. Pedroso, Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review, Food Chemistry, 171: 315-322 (2015)

Chanarat, S., S. Benjakul y A. H-Kittikun, Comparative study on protein cross-linking and gel enhancing effect of microbial transglutaminase on surimi from different fish, J. Sci. Food Agric. 92:844-852 (2012)

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

Gauche C., T. Tomazi, P.L.M. Barreto, P.J. Ogliari y M.T. Bordignon-Luiz, *Physical properties of yogurt manufactured with milk whey and TG*, Food Science and Technology, 42(1): 239-243 (2009)

- Gauche C., J.T.C. Vieira, P.J. Ogliari y M.T. Bordignon-Luiz, *Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase*, *Process Biochemistry*, 43(7):788-794 (2008)
- Jozami, F. y R. Seselovsky, Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria. Elaboración de carne reconstituída.(2003). <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87761011>. Acceso: 29 de Diciembre (2014)
- Kudre, T. y S. Benjakul, Effects of Bambara Groundnut Protein Isolates and Microbial Transglutaminase on Textural and Sensorial Properties of Surmi Gel from Sardine (*Sardinella albella*), *Food and Bioprocess Technology*, 7(6): 1570-1580 (2014)
- Kuraishi, C., K. Yamasaki e Y. Susa, *Transglutaminase: its utilization in the food industry*, *Food Reviews International*, 17(2): 221-246 (2001)
- Larmond, E., Physical Requirements for Sensory Testing, *Food Technology*, 27-28 (1973)
- Martínez M., V. Robledo, G. Velásquez, J. Ramírez, M. Vázquez y R. Uresti, Effect precooking temperature and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) proteins, *Food Hydrocolloids*, 35: 264-269 (2014)
- Min B. y B.W. Green, 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 (2008)
- Noghani, F., A. Mofidi y M. Zarei, Effect of using microbial transglutaminase as a substitute for part of milk protein concentrate on the selected physicochemical and sensory properties of spinach yoghurt, *Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 9(3): 93-103 (2014)
- Özrenk E., The use of transglutaminase in dairy products, *International Journal of Dairy Technology*, 59 (1): 1-7 (2006)
- Palmeira, K. R., B.L. Rodrigues, L.V. Gaze, M.Q. Freitas, C.E. Teixeira, E.T. Marsico, A.G. Cruz, y C.A. Conte Junior, Use of transglutaminase, soybean waste and salt replacement in the elaboration of trout (*Oncorhynchus mykiss*) meatball, *International Food Research Journal* 21(4): 1597-1602 (2014)
- Peña, C. y M. Quirasco, ¿Enzimas en los alimentos? Bioquímica de lo comestible, *Revista Digital Universitaria*, 15(12) (2014). <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art94/index.html>. Acceso: 29 de Diciembre (2014)
- Reed, G., *Enzymes in food processing*, Academic Press, New York (1966)
- Roessler, E.B., G.A. Baker y M.A. Amerine, One-tailed and Two-tailed Tests in Organoleptics Comparisons, *Food Research*, 21(1): 117-121(1956)
- Schmidt H.H. y M. I. Pennacchiotti, *Las enzimas en los alimentos: Su importancia en la química y la tecnología de los alimentos*, Editado por Fundación Chile, Santiago, Chile (1982)
- Singh H., Modification of food proteins by covalent crosslinking, *Trends in Food Science and Technology*, (2), 196-200 (1991)
- Weng W. y H. Zheng, Effect of transglutaminase on properties of tilapia scale gelatin films incorporated with soy protein isolate, *Food Chemistry*, 169: 255-260 (2015)