

**APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA PRODUCIDA POR
Streptoverticillium ladakanum, EN MEDIOS A BASE DE HIDROLIZADOS
ENZIMÁTICOS DE SORGO ENRIQUECIDOS CON DDGS, EN REESTRUCTURADOS
CÁRNICOS Y PESQUEROS**

Guadalupe C. Rodríguez Castillejos^{1,2*}, Simón J. Téllez Luis², Jorge Lois Correa¹, José A. Ramírez de León³

¹Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, CICATA-IPN, Unidad Altamira. Km. 14:5 Carretera Tampico-Puerto Industrial Altamira, Altamira Tamaulipas CP 89600, México.

²Departamento de Ciencia y Tecnología de alimentos, U.A.M Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Calle 16 y Lago de Chapala, Reynosa, Tamaulipas, CP 88740, México.

³Centro de Excelencia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Matamoros 8 y 9 Colonia Centro, Ciudad Victoria, Tamaulipas, CP 87000, México.

RESUMEN

Se evaluó la eficiencia de transglutaminasa microbiana (MTGasa), producida por *Streptoverticillium ladakanum* en medios de fermentación a base de hidrolizados enzimáticos de sorgo adicionados con granos secos destilados de maíz (DDGS). La actividad y eficiencia de la enzima MTGasa fue evaluada mediante la obtención de reestructurados cárnicos y pesqueros. Se obtuvieron reestructurados de trucha y filetes de carne de res mediante la adición de 0.3 unidades/g de MTGasa obtenida de medios con hidrolizados enzimáticos de sorgo; 0.3 unidades/g de MTGasa comercial y controles sin enzima. La MTGasa de hidrolizados de sorgo incrementa más eficientemente las propiedades mecánicas de los productos e indujo a valores bajos de agua extraíble, similares a los presentados en los geles con enzima comercial ($p \leq 0.05$). Los resultados demuestran la eficiencia de la MTGasa producida con fuentes agrícolas.

ABSTRACT

The efficiency of microbial transglutaminase (MTGase), obtained by *Streptoverticillium ladakanum* in the fermentation of sorghum grain hydrolysates with **Dried Distillers Grains with Solubles** (DDGS) to increase mechanical properties of restructured beef and fish products, was evaluated. Fish gels were obtained from trout and whole pieces of "round tip steak", by adding MTGase obtained in the fermentation of sorghum hydrolysates at 0.3 units/g; adding commercial MTG at 0.3 units/g; without additives as control sample. MTGase from sorghum hydrolysates more efficiently increased the mechanical properties of restructured products and induced a low value of expressible water, similar to the commercial MTGase ($p \leq 0.05$). Results demonstrated the efficient MTGase from agricultural sources.

INTRODUCCIÓN

Las transglutaminasas (TGasas; EC 2.3.2.13) son una familia de proteínas presentes en la mayoría de tejidos y fluidos extracelulares de los vertebrados que están ampliamente distribuidas en la naturaleza [1]. Fueron identificadas [2] como enzimas presentes en el hígado de cobayo. A diferencia de la mayoría de las enzimas industriales –amilasas, lipasas y proteasas– que catalizan

reacciones de hidrólisis, inducen la polimerización de las proteínas. En consecuencia, son capaces de modificar las propiedades funcionales y de textura de las proteínas creando productos con mayor consistencia y de mejor calidad, siendo capaces de incorporar aminas dentro de las proteínas. Estas enzimas se distribuyen ampliamente en los seres vivos, encontrándose en tejidos animales, peces, plantas y microorganismos [1,2] y tienen una gran variedad de funciones biológicas.

La MTGasa tiene acción directa sobre las proteínas de los alimentos, dado que las proteínas son parte importante en una gran variedad de propiedades de los alimentos, su modificación trae cambios fisicoquímicos notables. La introducción de enlaces covalentes adicionales por la enzima es una herramienta para mejorar las propiedades funcionales de los alimentos, como, viscosidad, solubilidad, elasticidad, capacidad emulsificante, retención de agua, formación de geles y espumas, entre otras [3]. En alimentos se prefiere la modificación enzimática al uso de productos químicos con los que la probabilidad de formar compuestos tóxicos es más alta. El uso de MTGasa en la industria alimentaria inició con la producción de productos de surimi en Japón [4]. La reestructuración de la carne fresca ha sido una de las principales aplicaciones de la enzima. La MTGasa puede reestructurar cortes de carne de bajo costo, de diferentes especies, y mejorar su valor en el mercado de productos procesados [5].

Uno de los retos en la industria alimentaria es mejorar no sólo el contenido nutricional de los alimentos sino también su apariencia, esto lo hace más atractivo a la vista del consumidor y aumenta su valor en el mercado. Por otro lado, en la industria de cárnicos, principalmente los provenientes de res y puerco, los retazos de carne pierden valor comercial, por ello se han buscado varios métodos para reestructurar estos cortes y mejorar su apariencia. Anteriormente, se usaba la sal y el tratamiento térmico para reestructurar [6]. Estos productos reestructurados debían ser congelados o pre-cocidos para conservarse más tiempo; para evitar esto, se usaba una TGasa extraída del plasma, aunque era un proceso caro por la dificultad de purificar la enzima [7-9]

La enzima resultaba muy útil en la industria alimentaria; sin embargo, su costo es elevado debido principalmente al precio de las materias primas utilizadas en el medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo. Por ello, se evaluó la producción de la enzima en medios a base de hidrolizados enzimáticos de granos de sorgo rojo, maíz y granos secos de destilería (DDGS por sus siglas en inglés, **Dried Distillers Grains with Solubles**). Además de comprobar la producción y factibilidad de la enzima, es necesario saber si realmente es adecuada en la industria alimentaria. Para ello se realizó la producción de geles de carne de res y de pescado y se midieron los parámetros de color, textura y capacidad de retención de agua de los mismos

METODOLOGÍA

La enzima transglutaminasa se obtuvo en un medio de cultivo a base de un jarabe rico en glucosa obtenido por hidrólisis enzimática de granos de sorgo rojo suplementado con granos secos de destilería (DDGS por sus siglas en inglés *Dried Distillers Grains with Solubles*). El medio de cultivo contenía 30 g/L de glucosa, 2 g/L de DDGS, 15 g/L de caseína, 5 g/L de fosfato de sodio dibásico, 2 g/L de fosfato de potasio monobásico, 0.5 g/L de sulfato de magnesio, 10.5 g/L de peptona y 2 g/L de extracto de levadura [10]. Para la producción de la enzima se utilizó la cepa liofilizada de *Streptoverticillium ladakanum* NRRL-3191 proporcionada por el *National Center for Agricultural Research Service Culture Collection* (Peoria, Illinois, USA). Los productos cárnicos y pesqueros se obtuvieron adicionando MTGasa en las concentraciones óptimas de acuerdo a los resultados de trabajos anteriores en este campo. Los reestructurados fueron obtenidos empleando métodos de cortado, masajeo, mezclado, en presencia de sal.

Se utilizó MTGasa obtenida utilizando hidrolizados de sorgo y transglutaminasa comercial (*BioBond*TM TG-WM) como control. Se hicieron cuatro tratamientos, uno utilizando 0.3 U/g de MTGasa obtenida de hidrolizados, otro con 0.3 U/g de MTGasa comercial y dos sin enzima. A todos los tratamientos se les agregó 2 % de NaCl.

Geles de res y pescado

Los geles de pescado fueron obtenidos utilizando filetes de trucha, capturada en la laguna Madre de Tamaulipas y adquirida en la ciudad de Río Bravo, Tamaulipas. Los filetes se mantuvieron con hielo y posteriormente se almacenaron a 4 °C hasta su uso. La carne de res se obtuvo de una carnicería de la ciudad de Reynosa, Tamaulipas; eliminándose el exceso de grasa y tejido conectivo de los filetes. La carne de res fue fresca, sin proceso de congelación. La carne de res y pescado se lavó y se escurrió, se pesó y posteriormente se troceó manualmente en trozos de aproximadamente 5 cm. Una vez troceados, se colocaron en una cortadora (*Hobart*, modelo 84145, *Hobart Inc., Troy OH*) por dos minutos, en este tiempo se añadió 0.3% de enzima y 2 % de NaCl, si correspondía. Se repitió el mismo procedimiento con la carne que no llevaba enzima. La mezcla fue embutida utilizando tubos de acero inoxidable 18 cm de largo y 1.87 cm de diámetro interno, con una capacidad aproximada de 100 g. Los tubos fueron previamente lubricados con aceite comestible para facilitar la extracción del gel. Los tubos con pescado fueron incubados durante 30 minutos a 40 °C y posteriormente, a 90 °C por 15 minutos, ambos en baño maría. A continuación, se aplicó un choque térmico a 5 °C por 20 min. Los geles se refrigeraron y posteriormente se desmoldaron y empacaron al vacío. Se obtuvieron cuatro tratamientos: (a) geles de pescado con 0.5% de enzima comercial; (b) geles de pescado con enzima de hidrolizado de sorgo; Ambos tratamientos se incubaron por 30 min a 40 °C y se cocieron a 90 °C por 15 min. (c) geles de pescado sin enzima incubados a 40 °C por 30 min y cocidos a 90 °C por 15 min; y (d) geles de pescado sin enzima cocidos directamente a 90 °C por 15 min (control). Para el caso de los geles de carne de res los tubos se incubaron por 30 min a 50 °C de acuerdo a lo reportado por *Castro-Briones et al.*, [11], seguido por 15 min a 90 °C. Se aplicó un choque térmico mediante inmersión en agua helada, se refrigeraron y desmoldaron, los geles se guardaron en bolsas de plástico y se refrigeraron hasta su empleo para los análisis posteriores. Se obtuvieron los cuatro tratamientos igual a los obtenidos en geles de pescado pero la temperatura de incubación fue de 50 °C.

Determinación de textura

Las propiedades mecánicas se midieron usando un texturómetro *TA plus* (*Lloyd Instruments, Bestech, Australia*). Se utilizaron muestras cilíndricas con un diámetro de 2 cm y 2.5 cm de altura y se mantuvieron en bolsas de polietileno para evitar su deshidratación hasta su análisis. Para la compresión se utilizó una sonda cilíndrica de aluminio de 50 mm de diámetro. Las muestras fueron comprimidas hasta un 80% de su tamaño inicial, usando una velocidad de compresión de 60 mm/min. Se obtuvo los valores de fuerza máxima de fractura y dureza de las muestras utilizando el software *NEXYGENPlus data analysis*®.

Determinación de color

Se determinaron los atributos de color con la ayuda de un colorímetro *HunterLab MiniScan XE Plus* (modelo 45/0-L. *Hunter Assoc. Reston VA, USA*). Se calibró con las tejas blanca y negra; las muestras se colocaron en un fondo blanco y se realizaron tres mediciones obteniéndose los

parámetros de luminosidad (L^*), a^* y b^* de la escala de *Hunter*. Con estos datos se calculó los parámetros de saturación (C^*) y matiz (H^*) con las siguientes fórmulas:

$$\text{Saturación: } C = \sqrt{a^2 + b^2}$$

$$\text{Matiz: } h = \tan^{-1}(b/a)$$

Determinación del agua extraíble

Se pesaron aproximadamente 3 g de muestra y se envolvieron con papel *Whatman* No. 1, centrifugándose a 450xg por 5 min a 5 °C. Después de la centrifugación, las muestras se pesaron y se calculó el porcentaje de agua extraída, dividiendo el peso final entre el peso inicial y multiplicándolo por 100. Los experimentos fueron realizados por triplicado, el resultado reportado es la media de los tres tratamientos. Para el caso de la determinación de textura se hizo cinco repeticiones. Se aplicó un análisis de varianza simple considerando diferencias significativas con una $p \leq 0.05$. Para el análisis de los resultados se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) para establecer si había diferencias significativas para cada propiedad, posteriormente se realizó una comparación de medias, utilizando un $\alpha \leq 0.05$ en todos los análisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atributos de color en los reestructurados

Los atributos de color en geles de pescado se muestran en la Tabla 1. Los valores de a^* y b^* fueron valores en el área de los verdes (a-) y amarillos (b+). El valor de H^* (tono o matiz) fue ligeramente superior a 90 (91.5 a 94.4), lo que los ubica como geles amarillo-verdosos, pero el valor bajo de C^* (12.2 – 14.31) y alto de L^* (59.8 – 63.3) los ubica en el rango de los tonos grisáceos para la mayoría de los consumidores.

Tabla 1. Resultados de los parámetros de color de los geles de pescado.

Tratamiento	L^*	a^*	b^*	C^*	H^*
Control sin MTGasa (90°C/15 min)	61.54 ^a (± 2.48)	-0.4 ^a (± 0.10)	14.49 ^a (± 0.98)	14.49 ^b (± 0.98)	91.59 ^a (± 0.29)
Control sin MTGasa (40°C/30 min + 90°C/15 min)	62.94 ^a (± 2.31)	-0.35 ^a (+ 0.04)	14.37 ^{a,b} (+ 1.21)	14.38 ^b (+ 1.21)	94.41 ^b (+ 0.24)
MTGasa comercial (40°C/30 min + 90°C/15 min)	63.34 ^a (+ 3.17)	-0.81 ^a (± 0.38)	12.20 ^b (± 0.68)	12.23 ^a (± 0.64)	93.86 ^{a,b} (± 2.03)
MTGasa de hidrolizados (40°C/30 min + 90°C/15 min)	59.82 ^a (± 1.01)	-0.51 ^a (± 0.43)	13.38 ^a (± 0.10)	13.39 ^{a,b} (± 0.10)	92.2 ^a (± 1.82)

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Valores promedio de tres repeticiones y Desviación estándar.

Los resultados obtenidos para los atributos de color de los geles de carne se muestran en la tabla 2. El valor de a^* para todas las muestras fue positivo, lo que indica que tuvieron tonalidad rojiza. El valor de b^* de todos los geles también fue positivo, ubicándolos en los tonos amarillos. El valor de L^* fue cercano a 50 (48.7 – 50.6) indicando un color un poco oscuro. El valor de H^*

(tono ó matiz) varió de 71.6 a 72.6, indicando una coloración café-rojiza, de intensidad moderada de acuerdo con el valor de croma (C*) que varió de 17 a 17.3.

Tabla 2. Resultados de los parámetros de color de los geles de carne de res.

Tratamiento	L*	a*	b*	C*	H*
Control sin MTGasa (90°C/15 min)	49.51 ^a (± 1.82)	5.36 ^a (± 0.10)	16.14 ^a (± 0.23)	17.01 ^a (± 0.25)	71.63 ^a (± 0.20)
Control sin MTGasa (40°C/30 min + 90°C/15 min)	48.70 ^a (± 1.91)	5.45 ^a (± 0.21)	16.41 ^a (± 0.18)	17.30 ^a (± 0.18)	71.62 ^a (± 0.72)
MTGasa comercial (40°C/30 min + 90°C/15 min)	49.02 ^a (± 1.35)	5.32 ^a (± 0.26)	16.26 ^a (± 0.27)	17.10 ^a (± 0.32)	72.64 ^a (± 0.65)
MTGasa de hidrolizados (40°C/30 min + 90°C/15 min)	50.60 ^a (± 0.59)	5.25 ^a (± 0.16)	16.30 ^a (± 0.19)	17.12 ^a (± 0.22)	72.16 ^a (± 0.35) ^a

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Valores promedio de tres repeticiones y Desviación Estándar.

No hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los geles obtenidos con enzima comercial y con la enzima obtenida a partir de hidrolizados enzimáticos, para los atributos L*, C* y H*.

Debido a que el medio de cultivo producido con los hidrolizados era más oscuro que el medio común con glicerol y a que ello produjo una enzima un poco más oscura, era necesario evaluar si afectaba el producto final. Los resultados de los parámetros de color mostraron que no hubo diferencia significativa entre tratamientos en los geles de carne y pescado que se hicieron con la enzima de hidrolizados comparándolos con los que se hicieron con la enzima comercial. Este resultado es importante ya que el color de los alimentos es un parámetro fundamental en el gusto del consumidor, dado que en estudios anteriores en los que se produjo MTGasa utilizando hidrolizados ácidos de paja de sorgo sí se encontró diferencia significativa contra la enzima comercial; los geles con esta enzima eran más oscuros que los que se hicieron con enzima comercial. Este resultado nos confirma que puede ser factible la producción y uso de MTGasa con el medio de cultivo planteado.

Análisis de textura de los reestructurados

El análisis de textura de los geles de carne y pescado se realizó mediante el método de compresión uniaxial. Los resultados muestran que no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los geles que se hicieron con enzima comercial y los obtenidos con enzima de medios con hidrolizados enzimáticos. Los reestructurados con enzima presentaron mejores propiedades de textura que los controles (Tabla 3). En ambos casos, la enzima actuó de manera positiva en los reestructurados mejorando las características de los geles.

Tabla 3. Parámetros del análisis de textura de los geles de pescado.

Muestra	Trabajo Máx.	Módulo	Esfuerzo máx.	Deformación máx.	Dureza 60%
Control sin MTGasa (90°C/15 min)	0.034 ^b (±0.004)	0.226 ^b (±0.009)	0.057 ^b (±0.002)	0.603 ^b (±0.070)	4.056 ^b (±0.186)
Control sin MTGasa (40°C/30 min + 90°C/15 min)	0.033 ^b (± 0.005)	0.248 ^b (±0.013)	0.061 ^b (±0.004)	0.454 ^b (±0.045)	3.833 ^b (±0.452)

MTGasa comercial (40°C/30 min + 90°C/15 min)	0.140 ^a (±0.007)	0.215 ^{a,b} (±0.011)	0.142 ^a (±0.005)	0.986 ^a (±0.023)	10.774 ^a (±0.253)
MTGasa de hidrolizados (40°C/30 min + 90°C/15 min)	0.154 ^a (±0.007)	0.206 ^a (±0.009)	0.151 ^a (±0.004)	1.021 ^a (±0.024)	11.061 ^a (±0.209)

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Valores promedio de cinco repeticiones y Desviación estándar.

La tabla 4 muestra los resultados de cada parámetro de textura de los geles carne de res. Los geles de carne hechos con enzima de hidrolizados y de enzima comercial presentaron una mejor textura que los geles que no contenían enzima; la MTGasa mejoró la fuerza y la deformabilidad de los geles de carne.

Tabla 4. Parámetros del análisis de textura de los geles de carne de res.

Muestra	Trabajo Máx.	Módulo	Esfuerzo máx.	Deformación máx.	Dureza 60%
Control sin MTGasa (90°C/15 min)	0.022 ^{b,c} (±0.005)	0.323 ^{b,c} (±0.034)	0.062 ^a (±0.007)	0.349 ^b (±0.045)	3.756 ^b (±0.695)
Control sin MTGasa (50°C/30 min + 90°C/15 min)	0.018 ^c (±0.001)	0.284 ^c (±0.018)	0.055 ^a (±0.003)	0.321 ^b (±0.010)	3.087 ^b (±0.149)
MTGasa comercial (50°C/30 min + 90°C/15 min)	0.031 ^{a,b} (±0.006)	0.200 ^{a,b} (±0.096)	0.065 ^a (±0.007)	0.472 ^a (±0.054)	4.433 ^{a,b} (±0.709)
MTGasa de hidrolizados (50°C/30 min + 90°C/15 min)	0.037 ^a (±0.013)	0.210 ^a (±0.058)	0.064 ^a (±0.011)	0.572 ^a (±0.135)	4.518 ^a (±0.873)

^{a,b,c} Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Valores promedio de cinco repeticiones y Desviación estándar.

Se encontraron diferencias significativas entre los geles a los que se adicionó enzima y aquellos en los que no se adicionó. Sin embargo, no hubo diferencia entre los geles hechos con enzima comercial y la obtenida de hidrolizados. La textura de los alimentos es otro parámetro fundamental, no sólo por el aspecto de los mismos que pueden afectar la preferencia del consumidor, sino también porque está relacionada con el contenido y actividad de proteínas principalmente. Los geles con enzima, ya sea comercial o hecha con hidrolizados tuvieron una mayor fuerza que aquellos sin MTGasa, además de una menor deformabilidad. El resultado de los parámetros de textura indica que la enzima obtenida del medio con hidrolizados enzimáticos es funcional y por lo tanto es factible su producción y uso. Sin embargo, en este punto se logró una mejoría más notable en los geles de pescado que en los de carne. Los reestructurados de carne se incuban a temperaturas diferentes que los de pescado, aunque se tomó como referencia condiciones establecidas en otro estudio para carne de res. Es probable que se requieran más estudios sobre las temperaturas y tiempo adecuados para mejorar la acción de la MTGasa en carne de res. La enzima, tanto la comercial como la de hidrolizados, mejoró las propiedades

mecánicas de los hidrolizados, la enzima obtenida de hidrolizados tuvo el mismo efecto que la comercial; este incremento en las propiedades mecánicas se debe a que la enzima induce la formación de enlaces covalentes entre los residuos de lisina y glutamina de las proteínas, lo que favorece a la formación de una red tridimensional más fuerte.

Agua extraíble y capacidad de retención de agua

El contenido de agua extraíble está inversamente relacionado con la capacidad de retención de agua (CRA); por lo tanto, un bajo porcentaje de agua extraíble significa un alto porcentaje de CRA. Los resultados mostraron que hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los geles que tenían enzima con aquellos a los que no se les adicionó (Tabla 5 y 6). Los geles con enzima mostraron una menor cantidad de agua extraíble y no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los geles hechos con enzima de hidrolizados y los que se hicieron con enzima comercial.

Tabla 5. Porcentaje de agua extraíble en los geles de pescado.

Tratamiento	Agua extraíble en geles de pescado (%)
Control sin MTGasa (90°C/15 min)	10.44 ^b (± 0.50)
Control sin MTGasa (40°C/30 min + 90°C/15 min)	10.04 ^b (±0.61)
MTGasa comercial (40°C/30 min + 90°C/15 min)	6.37 ^a (± 0.67)
MTGasa de hidrolizados (40°C/30 min + 90°C/15 min)	6.48 ^a (± 0.73)

^{a,b,c}Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Valores promedio de cinco repeticiones y Desviación estándar.

Tabla 6. Porcentaje de agua extraíble en los geles de carne de res.

Tratamiento	Agua extraíble en geles de carne de res (%)
Control sin MTGasa (90°C/15 min)	12.7 ^b (± 1.38)
Control sin MTGasa (50°C/30 min + 90°C/15 min)	11.93 ^b (±0.71)
MTGasa comercial (50°C/30 min + 90°C/15 min)	8.17 ^a (± 0.81)
MTGasa de hidrolizados (50°C/30 min + 90°C/15 min)	7.38 ^a (± 1.27)

^{a,b,c}Letras distintas indican diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Valores promedio de tres repeticiones y Desviación estándar.

La adición de la enzima mejoró la capacidad de retención de agua de los reestructurados. La absorción total de agua aumenta con la concentración proteica; sin embargo, no solo es la

concentración de la proteína sino la conformación de las mismas. La modificación proteica permite la asociación con el agua mediante puentes de hidrógeno. Un alimento cuyas proteínas se encuentren desnaturalizadas o agregadas de manera incorrecta tiende a retener menos agua. La MTGasa mejora la interacción proteína-proteína formando una red tridimensional que permite el atrapamiento del agua. La MTGasa obtenida de medios con hidrolizados enzimáticos mostró el mismo efecto positivo en el parámetro de CRA lo que confirma nuevamente la actividad de la misma.

CONCLUSIONES

La MTGasa obtenida con hidrolizados enzimáticos permitió obtener geles de carne de res y pescado con las mismas propiedades mecánicas, propiedades de color y capacidad de retención de agua, incluso fueron iguales a los reestructurados obtenidos con MTGasa comercial. Debido al alto costo de esta enzima, la transglutaminasa obtenida por hidrolizados enzimáticos es una alternativa viable para su aplicación en la industria alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wilhelm B, Meinhardt A, Seitz J, Transglutaminases: purification and activity assays, *J Chromatogr B Biomed Appl.*, 84:163-77, 1996.
2. Clarke DD, Mycek MJ, Neidle A, Waelsch H, The incorporation of amines into proteins, *Arch Biochem Biophys.*, 79: 338-354, 1959.
3. Liu M and Damodaran S, Effect of transglutaminase-catalyzed polymerization of b-casein on its emulsifying properties, *J. Agric. Food Chem.*, 47:1514-1519, 1999.
4. Jaros D, Partschfeld C, Henle T, Rohm H, Transglutaminase in dairy products: chemistry, Physics, applications, *J Texture Stud.*, 37: 113-155, 2006.
5. Lee EY, Park J, Pressure Inactivation Kinetics of Microbial Transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*, *J Food Sci.*, 67:1103-1007, 2002.
6. Huffman DL, Ly AM, Cordray JC, Effect of salt concentration on quality of restructured pork chops, *J Food Sci.*, 46: 1563-1565, 1981.
7. Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsuura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M, Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms, *Agric Biol Chem.*, 53: 2613-2617, 1989.
8. Ikura K, Kometani T, Yoshikawa M, Sasaki R, Chiba H, Cross-linking of casein components by transglutaminase, *Agric Biol Chem.*, 44:1567-1573, 1980.

9. Washizu K, Ando K, Koikeda S, Hirose S, Matsuura A, Takagi H, Motoki M, Takeuchi K, Molecular cloning of the gene for microbial transglutaminase from *Streptoverticillium* and its expression in *Streptomyces lividans*, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 58:82-7, 1994.
10. Rodríguez-Castillejos GC, Tellez-Luis SJ, Vázquez M, Lois-Correa JA, Ramírez JA, Evaluation of sorghum grain hydrolysates and dried distillers grains with solubles for the production of microbial transglutaminase, *CyTA Journal of food*, DOI: 10.1080/19476337.2013.801520, 2013
11. Castro-Briones M, GN Calderón, G Velázquez, M Salud-Rubio, M Vázquez, JA Ramírez. 2009. Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. *J Food Process Eng.* 32:221-234.