

TESIS DE DOCTORADO

**APLICACIÓN DE  
TRANSGLUTAMINASA EN LA  
OPTIMIZACIÓN DE PRODUCTOS  
LÁCTEOS. EVALUACIÓN FÍSICO-  
QUÍMICA Y SENSORIAL**

María Belén García Gómez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INNOVACIÓN EN SEGURIDAD Y TECNOLOGÍA  
ALIMENTARIAS

LUGO

2019





## DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

**Aplicación de transglutaminasa en la optimización de productos lácteos. Evaluación físico-química y sensorial**

**Dña. María Belén García Gómez**

Presento mi Tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La Tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la Tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La Tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la Tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

*En Lugo, 28 de noviembre de 2019*

Fdo: María Belén García Gómez





## AUTORIZACIÓN DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS DOCTORAL

Aplicación de transglutaminasa en la optimización de productos  
lácteos. Evaluación físico-química y sensorial

**Dña. María Ángeles Romero Rodríguez y Dña. María Lourdes Vázquez Odériz**

### INFORMAN:

*Que la presente Tesis se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **María Belén García Gómez**, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doutorado de la USC, y que como directoras de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.*

*En Lugo, 28 de noviembre de 2019*

Fdo: María Ángeles Romero Rodríguez

Fdo: María Lourdes Vázquez Odériz



## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Ángeles y Lourdes, gracias por contar conmigo y darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral, por vuestro apoyo, orientación, visión crítica y por todas las horas que me dedicasteis.

A Nieves, por tener siempre una solución, una alternativa, una idea, gracias por tu tiempo y por resolver todas esas dudas estadísticas que me asaltan continuamente.

A Manuel, por la ayuda y apoyo durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por tu capacidad de simplificar las cosas y por tener siempre una solución. Gracias a ti y a Esther por “vuestra” transglutaminasa.

A Jaime, del Aula de Productos Lácteos, por tu colaboración y buena disposición en la elaboración de yogures.

A la empresa BDF Natural Ingredients por el asesoramiento y por suministrarnos la transglutaminasa y los cultivos.

Y como no, a los catadores, sin los cuales no sería posible este trabajo. Gracias Sandra, Maite, Jos, Cristina A., Pablo, Raúl, Jesús, Mónica, Cristina V., Loida, De la Iglesia, Vanesa, Raquel, Lucía Le., Lucía L., Matilde y Lía por estar siempre dispuestos “a probar”.

A los consumidores que participaron y colaboraron desinteresadamente en este estudio.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) por el apoyo financiero para este trabajo (proyecto RTC2014-1835-2).

A Vanesa y Mar, que me acogieron en el laboratorio como una más cuando la idea de la Tesis ni rondaba mi cabeza, con vosotras empezó todo, gracias por todos los buenos momentos.

A Raquel, con quien también compartí un tiempo en el laboratorio, gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme y por seguir ahí.

A Olga e Iria, a quienes conocí en el laboratorio, un poco por casualidad, gracias por apoyarme en los momentos duros, por ayudarme a seguir y por los ánimos que me dais continuamente.

A Mercedes, porque a veces un punto de vista totalmente aséptico te puede salvar la vida. Gracias por tu apoyo y ayuda desinteresada.

A Felipe y a mis padres, José Manuel e Isabel, gracias por vuestra infinita paciencia, por apoyarme, y por ayudarme a levantarme cada vez que me caigo. Gracias por estar ahí cada día de mi vida.

¡Gracias a todos!





## RESUMEN

El yogur y el queso, son productos ampliamente consumidos desde tiempos ancestrales, tanto en España como en las diferentes regiones de la geografía mundial. Debido a su gran demanda, son, por lo tanto, productos con un gran peso económico en la industria alimentaria.

Las transglutaminasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de reticulación entre grupos  $\gamma$ -carboxamida de los residuos de glutamina y los grupos  $\varepsilon$ -amino de los residuos de lisina. La producción industrial de transglutaminasa microbiana (mTG) permite su uso en la industria alimentaria. La mTG es activa en una amplia gama de temperaturas, es estable en el rango de pH habitual que presentan los alimentos durante su procesado (pH 5-9) y su actividad es calcio-independiente. La literatura indica que esta enzima es adecuada para mejorar muchas características importantes en los alimentos proteicos, entre ellos los productos lácteos, ya que la caseína es un buen sustrato para la mTG, debido a que su estructura abierta permite la formación de un número elevado de enlaces cruzados covalentes. La aplicación de la mTG en yogures aumenta la firmeza y disminuye la sinéresis, pudiéndose obtener yogures desnatados con propiedades sensoriales similares a los enteros. En quesos, existen datos que sugieren que su aplicación es una herramienta eficaz para incrementar el rendimiento quesero, y aunque en relación a la fuerza del coágulo la información es contradictoria, los datos sugieren que las condiciones de operación son determinantes en este aspecto.

En el presente trabajo, se ensayan diferentes condiciones de operación para la aplicación de transglutaminasa microbiana (mTG) en yogur desnatado. Por una parte, se estudia y compara el efecto de la incubación previa de la leche con la mTG, seguida de una etapa de inactivación térmica de la misma, con el efecto de la adición de la mTG simultáneamente con el cultivo iniciador. Por otra parte, se analiza el efecto de diferentes niveles de dosificación de la mTG (0.5, 1 y 2 U·g<sup>-1</sup> de proteína) y se comparan 2 mTGs diferentes.

Tras el análisis de los resultados se seleccionan las condiciones óptimas de operación. En la elaboración de yogur desnatado, la adición de mTG (0.76 U·g<sup>-1</sup> de proteína), al mismo tiempo que el cultivo iniciador, da lugar a la obtención de un yogur más firme y con menos sinéresis que el control sin mTG. En base a estos resultados, a la aceptación de estos productos por parte del consumidor y a que su vida útil es similar a la de un Control sin mTG, se considera que la mTG es una alternativa para evitar los costes de la fortificación con leche desnatada en polvo y/o la adición de estabilizantes en la producción de yogur desnatado.

En el caso del queso fresco, elaborado con leche entera, se ensaya una única dosis de mTG (0.8 U·g<sup>-1</sup> de proteína) que se adiciona a la leche antes de añadir el cuajo. Se estudia el efecto de la mTG combinada con diferentes tipos de cuajo comerciales (cuajo animal, quimosina, cuajo vegetal y cuajo microbiano). Se observa que los parámetros de textura y el rendimiento del queso se ven afectados por el tratamiento con mTG, siendo los quesos coagulados con cuajo animal los más afectados, tanto desde un punto de vista sensorial como físico-químico, disminuyendo de manera significativa la dureza instrumental, y a nivel sensorial, incrementándose la humedad y la persistencia. Además, se observa un ligero aumento en el rendimiento. Sin embargo, los consumidores muestran una mayor aceptación y preferencia por el queso coagulado con cuajo vegetal y mTG. En cuanto a la evolución de los diferentes parámetros durante el almacenamiento, se observa que en general, a pesar de las diferencias entre la muestra con mTG y la muestra control, evolucionan de manera similar.

**Palabras clave:** transglutaminasa microbiana; yogur; queso; sensorial; físico-químico; TPA; catadores; consumidores.



## RESUMO

O iogur e o queixo, son produtos amplamente consumidos dende tempos ancestrais, tanto en España como nas diferentes rexións da xeografía mundial. Debido a súa gran demanda, son, polo tanto, produtos cun gran peso económico na industria alimentaria.

As transglutaminasas son un grupo de enzimas que catalizan reaccións de reticulación entre grupos  $\gamma$ -carboxamida 2 residuos de glutamina e os grupos  $\varepsilon$ -amino 2 residuos de lisina. A produción industrial de transglutaminasa microbiana (mTG) permite o seu uso na industria alimentaria. A mTG é activa nunha ampla gama de temperaturas, é estable no rango de pH habitual que presentan os alimentos durante o seu procesamento (pH 5-9) e a súa actividade é calcio-independente. A literatura indica que esta enzima é axeitada para mellorar moitas características importantes nos alimentos proteicos, entre eles os produtos lácteos, xa que a caseína é un bo substrato para a mTG, debido a que a súa estrutura aberta permite a formación dun número elevado de enlaces cruzados covalentes. A aplicación da mTG en iogures aumenta a firmeza e diminúe a sinérese, podéndose obter iogures desnatados con propiedades sensoriais similares ós enteiros. En queixos, existen datos que suxiren que súa aplicación é unha ferramenta eficaz para incrementar o rendemento queixeiro, e aínda que en relación a forza do coágulo a información é contraditoria, os datos suxiren que as condicións de operación son determinantes neste senso.

No presente traballo, ensáianse diferentes condicións de operación para a aplicación da transglutaminasa microbiana (mTG) en iogur desnatado. Por unha parte, estúdase e compárase o efecto da incubación previa do leite coa mTG, seguida dunha etapa de inactivación térmica da mesma, co efecto da adición da mTG simultaneamente co cultivo iniciador. Por outra parte, analízase o efecto de diferentes niveis de dosificación da mTG (0.5, 1 y 2 U·g<sup>-1</sup> de proteína) e compáranse 2 mTGs diferentes.

Tras a análise dos resultados selecciónanse as condicións óptimas de operación. Na elaboración de iogur desnatado, a adición de mTG (0.76 U·g<sup>-1</sup> de proteína), o mesmo tempo que o cultivo iniciador, da lugar a obtención dun iogur máis firme e con menos sinérese que o control sen mTG. En base a estes resultados, á aceptación destes produtos por parte do consumidor e a que súa vida útil é similar á dun control sen mTG, a mTG é unha alternativa para evitar os custos da fortificación con leite desnatada en pó e/ou a adición de estabilizantes na produción de iogur desnatado.

No caso do queixo fresco, elaborado con leite enteira, ensáíase unha única dose de mTG (0.8 U·g<sup>-1</sup> de proteína) que se adiciona o leite antes de engadir o callo. Estúdase o efecto da mTG combinada con diferentes tipos de callo comerciais (callo animal, quimosina, callo vexetal e callo microbiano). Obsérvase que os parámetros de textura e o rendemento do queixo vense afectados polo tratamento con mTG, sendo os queixos callados con callo animal os máis afectados, tanto desde un punto de vista sensorial como físico-químico, diminuindo de maneira significativa a dureza instrumental, e a nivel sensorial, incrementándose a humidade e a persistencia. Ademais, obsérvase un lixeiro aumento no rendemento. Sen embargo, os consumidores mostran unha maior aceptación e preferencia polo queixo callado con callo vexetal e mTG. En canto á evolución dos diferentes parámetros durante o almacenamento, obsérvase que en xeral, a pesar das diferencias entre a mostra con mTG e a mostra control, evolucionan de maneira similar.

**Palabras chave:** transglutaminasa microbiana; iogur; queixo; sensorial; físico-químico; TPA; catadores; consumidores.



## ABSTRACT

Yogurt and cheese are products widely consumed since ancient times, both in Spain and in the different regions of the world geography. Due to their high demand, therefore, they are products with great economic weight in the food industry.

Transglutamines are a group of enzymes that catalyze cross-linking reactions between  $\gamma$ -carboxamide groups of glutamine residues and  $\epsilon$ -amino groups of lysine residues. The industrial production of microbial transglutaminase (mTG) allows its use in the food industry. The mTG is active in a wide range of temperatures, is stable in the usual pH range of food processing (pH 5-9) and its activity is calcium-independent. The literature suggests that this enzyme is suitable for improving many important characteristics of proteinaceous foods, including dairy products, since casein is a good substrate for mTG, because its open structure allows the formation of a large number of covalent cross-linkings. The application of mTG in yogurts increases firmness and reduces syneresis, allowing obtaining skimmed yogurts with sensory properties similar to the whole ones. In cheese, there are data that suggest that its application is an effective tool to increase cheese yield, and although in relation to clot strength the information is contradictory, the data suggests that the operating conditions are decisive in this regard.

In this study, different operating conditions are tested for the application of microbial transglutaminase (mTG) in skimmed yogurt. On the one hand, the effect of the previous incubation of milk with mTG followed by a step of thermal inactivation is studied and compared with the effect of adding the mTG simultaneously with the starter culture. And, on the other hand, the effect of different mTG dosage levels (0.5, 1 and 2 U·g<sup>-1</sup> of protein) is analyzed and 2 different mTG are compared.

After the analysis of the results, the optimal operating conditions are selected. In the preparation of skimmed yogurt, the addition of mTG (0.76 U · g<sup>-1</sup> of protein), at the same time as the starter culture, results in obtaining a firmer yogurt with less syneresis than a control without mTG. Based on these results, the acceptance of these products by the consumers and a similar shelf life than a control without mTG, the mTG is an alternative to avoid the costs of fortification with skim milk powder and/or the addition of stabilizers in the skim production yogurt.

In fresh cheese, made with whole milk, only a dose of mTG (0.8 U · g<sup>-1</sup>) is tested and added to the milk before the rennet addition. The effect of the mTG combined with different types of commercial rennet (animal rennet, chymosin, vegetable rennet and microbial rennet) is studied. It is observed that the parameters of texture and cheese yield are affected by the mTG treatment, being the cheeses coagulated with animal rennet the most affected, both from a sensory and physico-chemical point of view. A significantly decreased on instrumental hardness is observed, and at the sensory level, a increasing of moisture and persistence. In addition, there is a slight increase in performance. However, consumers show greater acceptance and preference for cheese coagulated with vegetable rennet and mTG. Regarding the evolution of the different parameters during storage, overall, it is observed that despite the differences identified between the sample with mTG and the control sample, they evolve in a similar way.

**Keywords:** microbial transglutaminase; yogurt; cheese; sensory; physico-chemical; TPA; trained judges; consumers.



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 TRANSGLUTAMINASA	2
1.1.1 Antecedentes	2
1.1.2 Obtención de la transglutaminasa microbiana a partir de <i>S. mobaraensis</i>	7
1.1.3 Medida de la actividad de la transglutaminasa microbiana	8
1.1.3.1 Método de Grossowicz o de Folk	8
1.1.3.2 Incorporación de la putrescina con carbono-14	8
1.1.3.3 Otros métodos	9
1.1.4 Estructura de la transglutaminasa microbiana	9
1.1.5 Características de la mTG	11
1.1.5.1 pH y temperatura	11
1.1.5.2 Presión hidrostática	12
1.1.5.3 Factores de activación	13
1.1.5.4 Factores inhibidores	13
1.1.5.5 Especificidad del sustrato	14
1.2 APLICACIONES DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	14
1.2.1 Mecanismos de acción de la mTG en las propiedades funcionales	16
1.2.1.1 Solubilidad	16
1.2.1.2 Formación de geles	17
1.2.1.3 Formación de emulsiones y espumas	17
1.2.1.4 Capacidad de retención de agua	18
1.2.1.5 Viscosidad	18
1.2.2 Aplicaciones de la mTG en productos lácteos	18
1.2.2.1 La leche como sustrato	18
1.2.2.2 Aplicación de la mTG en yogur: efectos y métodos de aplicación	21
1.2.2.3 Aplicación de la mTG en queso: efectos y métodos de aplicación	25
1.2.2.4 La aplicación de la mTG en otros productos lácteos	29
1.2.3 Aplicaciones de la mTG en otros productos alimenticios	29
1.2.3.1 Productos cárnicos	29
1.2.3.2 Productos pesqueros	30
1.2.3.3 Productos derivados del trigo	30
1.2.3.4 Productos derivados de soja	31
1.2.3.5 Films comestibles	31
1.2.4 Otras aplicaciones de la mTG	32
1.3 ANÁLISIS SENSORIAL	32
1.3.1 Análisis sensorial analítico u objetivo	33
1.3.1.1 Grupo de sujetos	33
1.3.1.2 Lugar de realización de las pruebas	34
1.3.1.3 Presentación de las muestras	35
1.3.1.4 Tipos de pruebas	35
1.3.2 Análisis sensorial hedónico o estudios con consumidores	37
1.3.2.1 Grupo de sujetos	37

1.3.2.2 Lugar de realización de las pruebas	37
1.3.2.3 Presentación de las muestras	37
1.3.2.4 Tipos de pruebas	38
1.4 MEDIDA INSTRUMENTAL DE LA TEXTURA	38
1.5 BIBLIOGRAFÍA	39
2. OBJETIVOS	57
3. PLAN DE TRABAJO	59
3.1. APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (mTG) EN YOGUR FIRME	59
3.2. APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (mTG) EN QUESO FRESCO	61
4. EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE YOGURES DESNATADOS PRODUCIDOS CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA	64
4.1 INTRODUCCIÓN	65
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	66
4.2.1 Materias primas	66
4.2.2 Elaboración de los yogures	66
4.2.3 Evaluación físico-química de los yogures	67
4.2.4 Análisis estadístico	68
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
4.3.1 Evaluación del método de adición de la mTG	68
4.3.2 Evaluación de la dosis de mTG	71
4.3.3 Evaluación del origen de la mTG	73
4.4 CONCLUSIONES	75
4.5 AGRADECIMIENTOS	76
4.6 BIBLIOGRAFÍA	76
5. EVALUACIÓN SENSORIAL DE UN YOGUR DESNATADO PRODUCIDO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA Y COMPARACIÓN CON PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	80
5.1 INTRODUCCIÓN	81
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	82
5.2.1 Materiales	82
5.2.2 Elaboración de los yogures	82
5.2.3 Evaluación sensorial	83
5.2.4. Análisis estadístico	84
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
5.3.1 Validación del panel	85
5.3.2 Evaluación del método de adición de la mTG	86
5.3.3 Evaluación de la dosis de mTG	88
5.3.4 Evaluación del origen de la mTG	90
5.4. CONCLUSIONES	93
5.5 AGRADECIMIENTOS	93
5.6 BIBLIOGRAFÍA	93
6. CALIDAD SENSORIAL Y ACEPTACIÓN DEL CONSUMIDOR DE YOGUR DESNATADO PRODUCIDO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN UNA PLANTA PILOTO	99
6.1 INTRODUCCIÓN	100
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS	101



6.2.1 Materias primas	101
6.2.2 Elaboración de los yogures	102
6.2.3 Análisis descriptivo cuantitativo	102
6.2.4 Análisis con un panel de consumidores	103
6.2.5. Análisis estadístico	104
6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	104
6.3.1 Análisis descriptivo cuantitativo	104
6.3.2 Evaluación con consumidores	105
6.3.3 Relación entre la aceptabilidad, la preferencia y los atributos sensoriales	108
6.4. CONCLUSIONES	108
6.5 AGRADECIMIENTOS	109
6.6 BIBLIOGRAFÍA	109
7. YOGUR DESNATADO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA: EVALUACIÓN DE LA ACEPTACIÓN DEL CONSUMIDOR	115
7.1 INTRODUCCIÓN	116
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	117
7.2.1 Materias primas	117
7.2.2 Elaboración de los yogures	118
7.2.3 Análisis sensorial descriptivo	118
7.2.4 Análisis con un panel de consumidores	119
7.2.5. Análisis estadístico	119
7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	120
7.3.1 Análisis sensoril descriptivo	120
7.3.2 Perfil del consumidor	121
7.3.3 Aceptación del consumidor	121
7.3.4 Preferencia del consumidor	123
7.3.5 Correlación entre las valoraciones del panel entrenado y de los consumidores	125
7.4. CONCLUSIONES	125
7.5 AGRADECIMIENTOS	125
7.6 BIBLIOGRAFÍA	126
8. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES Y FÍSICO-QUÍMICAS DEL YOGUR DESNATADO OBTENIDO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA	131
8.1 INTRODUCCIÓN	132
8.2. MATERIALES Y MÉTODOS	133
8.2.1 Materias primas	133
8.2.2 Elaboración de los yogures	133
8.2.3 Medidas físico-químicas	134
8.2.4 Evaluación sensorial	134
8.2.5. Análisis estadístico	135
8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
8.3.1 Análisis instrumental	135
8.3.2 Análisis sensorial	138
8.3.3 Relación entre las medidas instrumentales y sensoriales	142
8.4. CONCLUSIONES	146
8.5 AGRADECIMIENTOS	146
8.6 BIBLIOGRAFÍA	146

9. EFECTO DEL TIPO DE CUAJO Y LA ADICIÓN DE TRANSGLUTAMINASA EN LA PRODUCCIÓN DE QUESO FRESCO: EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TEXTURALES _____	152
9.1 INTRODUCCIÓN _____	153
9.2. MATERIALES Y MÉTODOS _____	155
9.2.1 Materias primas _____	155
9.2.2 Elaboración del queso _____	155
9.2.3 Medidas físico-químicas _____	157
9.2.4 Análisis estadístico _____	157
9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	157
9.3.1 Efecto del tipo de cuajo _____	157
9.3.2 Efecto de la adición de mTG _____	159
9.4. CONCLUSIONES _____	166
9.5 AGRADECIMIENTOS _____	166
9.6 BIBLIOGRAFÍA _____	166
10. EFECTO DEL TIPO DE CUAJO Y DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA SOBRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DEL QUESO _____	172
10.1 INTRODUCCIÓN _____	173
10.2. MATERIALES Y MÉTODOS _____	175
10.2.1 Materias primas _____	175
10.2.2 Elaboración del queso _____	176
10.2.3 Análisis de los parámetros de textura _____	176
10.2.4 Evaluación sensorial descriptiva cuantitativa _____	176
10.2.5 Análisis estadístico _____	177
10.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	178
10.3.1 Glosario de descriptores: generación y reducción de descriptores _____	178
10.3.2 Evaluación del panel _____	179
10.3.2.1 Sensibilidad/capacidad de discriminación _____	181
10.3.2.2 Grado de acuerdo del panel/consistencia/reproductibilidad _____	181
10.3.2.3 Repetibilidad _____	182
10.3.2.4 Uso de la escala _____	182
10.3.3 Perfil sensorial _____	182
10.3.3.1 Efecto del tipo de cuajo _____	184
10.3.3.2 Efecto de la adición de mTG _____	185
10.3.3.3 Relación entre las medidas sensoriales e instrumentales de textura _____	186
10.4 CONCLUSIONES _____	188
10.5 AGRADECIMIENTOS _____	188
10.6 BIBLIOGRAFÍA _____	188
11. EFECTO DEL TIPO DE CUAJO Y DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA SOBRE LA ACEPTACIÓN POR PARTE DEL CONSUMIDOR DEL QUESO FRESCO Y EVALUACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS A LO LARGO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO _____	196
11.1 INTRODUCCIÓN _____	197
11.2. MATERIALES Y MÉTODOS _____	199
11.2.1 Materias primas _____	199
11.2.2 Elaboración del queso _____	199
11.2.3 Evaluación hedónica con consumidores _____	199
11.2.4 Evaluación sensorial descriptiva cuantitativa _____	200

11.2.5 Análisis instrumental de la textura	200
11.2.6 Análisis estadístico	200
11.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	201
11.3.1 Aceptación y preferencia del consumidor	201
11.3.2 Evolución durante el tiempo de almacenamiento	204
11.3.2.1 Características físico-químicas	204
11.3.2.2 Análisis sensorial	207
11.3.2.3 Relación entre las características físico-químicas y sensoriales	210
11.3.3 Relación entre las evaluaciones del panel entrenado y la aceptación del consumidor	212
11.4 CONCLUSIONES	212
11.5 AGRADECIMIENTOS	213
11.6 BIBLIOGRAFÍA	213
12. CONCLUSIONES GENERALES	217
13. ANEXOS	219





# 1. INTRODUCCIÓN

Desde el Neolítico la leche y los derivados lácteos son utilizados como alimento debido a que presentan un elevado valor nutritivo. En España, el consumo de leche y de productos lácteos aumenta progresivamente a partir de los años 50 del siglo XX (FEN, 2016).

Según el último informe del consumo alimentario en España (MAPA, 2019), durante el año 2018, se produce un incremento del consumo de derivados lácteos del 1,5% respecto al año 2017, siendo las leches fermentadas las que tienen la mayor cuota de consumo en volumen y los quesos los que ocupan el segundo lugar.

Los yogures son a su vez, dentro de las leches fermentadas, los productos con mayor proporción de volumen con una cuota del 67.6% y una variación con respecto al año anterior creciente (+2.9%). El consumo total de yogures en los hogares españoles en el año 2018 es de 450 millones de kg (145.7 millones de kg corresponden a yogur desnatado), con un impacto económico de 825 € (Statista, 2019).

El consumo de queso presenta un aumento del 1.4% en los hogares españoles durante el año 2018, siendo el queso fresco el que tiene la mayor proporción de volumen (más de una cuarta parte del total, 27.4%). El consumo en ese año de queso fresco es de 97 millones de kg con un impacto económico de 502 millones de €.

Aún a pesar de éstas buenas cifras para el sector, la industria alimentaria se enfrenta continuamente a importantes desafíos para poder mantener sus productos en el mercado. Así, por una parte, debe satisfacer las demandas del consumidor ofreciendo productos con unas buenas características nutricionales y sensoriales y con una vida útil adaptada al estilo de vida actual y, por otra, debe asegurar el mantenimiento de sus márgenes de beneficio, reduciendo los costes y optimizando los procesos productivos a fin de obtener los máximos rendimientos.

Diferencias en la composición de los alimentos conllevan asociadas, generalmente, diferentes características organolépticas que el consumidor es capaz de detectar y que pueden afectar a su grado de aceptación o rechazo. Por ello, el conocimiento profundo de los diferentes componentes de los alimentos, y sus posibles modificaciones tecnológicas, permite a la industria afrontar sus desafíos y alcanzar nuevos retos.

Un ejemplo lo constituye la utilización en la industria alimentaria de enzimas para polimerizar proteínas (Góes-Favoni and Bueno, 2014). Las proteínas tienen varios grupos reactivos para la actuación enzimática. Las reacciones obtenidas dependen del tipo de enzima utilizada, de la accesibilidad a los grupos reactivos y de las condiciones de operación utilizadas (Buchert et al., 2010). Muestra de ello es que en los últimos años aparecen muchas publicaciones científicas relacionadas con la investigación de enzimas, tanto en lo que se refiere a su biosíntesis, como a su aplicación en la industria alimentaria (Kieliszek and Misiewicz, 2014). Entre estas enzimas, destaca la transglutaminasa microbiana (mTG), que permite la modificación funcional de los alimentos formados por matrices proteicas, de una manera eficiente, segura y controlada (Góes-Favoni and Bueno, 2014), con unos requerimientos de operación idóneos para su aplicación en la industria alimentaria.

## 1.1 TRANSGLUTAMINASA

### 1.1.1 Antecedentes

En 1957, se introduce el término transglutaminasa para describir la actividad de transaminación observada en el hígado de cobaya. Estos primeros estudios, en los que se hace referencia a la transglutaminasa demuestran que se puede llevar a cabo la modificación de matrices proteicas incorporando aminos primarias a proteínas (Sarkar *et al.*, 1957; Clarke *et al.*, 1959; Mycek *et al.*, 1959).

La transglutaminasa es una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza, identificándose 9 isoformas en diferentes tejidos y fluidos corporales de mamíferos, de las cuales, 7 están bien caracterizadas a nivel proteico (Tabla 1.1). Algunas de las más estudiadas para su aplicación en la industria alimentaria, son el Factor XIIIa y la TGasa2, la primera se relaciona con la coagulación sanguínea en humanos, con la cicatrización de heridas, con la queratinización epidérmica y con la rigidez de la membrana eritrocitaria, mientras que la segunda, presente en el hígado, interviene en la diferenciación y en la proliferación de las células (Mariniello *et al.*, 2008). También se identifican otras isoformas en otros vertebrados, como en músculos de peces (Worratao and Yongsawatdigul, 2005; Yasueda *et al.*, 2014) y en mollejas de pollo (Puszkin and Raghuraman, 1986); en invertebrados como algunos nematodos (Mádi *et al.*, 1998), las estrellas de mar (Sugino *et al.*, 2002) o las ostras (Kumazawa *et al.*, 1997); en tejidos de plantas (Icekson and Apelbaum, 1987); en hongos como *Saccharomyces cerevisiae* (Iranzo *et al.*, 2002) y en microorganismos como *Streptomyces mobaraensis* (Ando *et al.*, 1989) o *Bacillus circulans* (Barros *et al.*, 2003).



Tabla 1.1. Diferentes isoformas de la transglutaminasa presente en mamíferos. Adaptada y modificada de (Mariniello *et al.*, 2008; Facchiano and Facchiano, 2009; Komáromi *et al.*, 2011).

Enzima	Activación	Nº de aminoácidos (Pm, Da)	Localización	Función fisiológica
FXIII	Ca <sup>2+</sup> y trombina	FXIIIa: 731 (83136) FXIIIb: 641 (73207)	Plaquetas, astrocitos, células dendríticas dérmicas, condrocitos, placenta, plasma y líquido sinovial	Coagulación de la sangre, cicatrización de heridas, angiogénesis y mantenimiento del embarazo
TGasa 1	Proteólisis	816 (89656)	Queratinocitos y cerebro como membrana de unión y en formas solubles	Formación de envoltura celular en la diferenciación de queratinocitos
TGasa 2	Ca <sup>2+</sup>	686 (77198)	Ubicua en tejidos, pero también en el espacio extracelular y nuclear	Muerte y diferenciación celular programada, funciones del citoesqueleto, motilidad y adhesión celular y transducción de señales
TGasa 3	Ca <sup>2+</sup> , proteólisis	692 (76501)	Cerebro, queratinocitos y folículos capilares	Formación de envoltura celular en la diferenciación terminal de los queratinocitos
TGasa 4	Ca <sup>2+</sup> y ácido fosfatídico	683 (77014)	Glándula prostática	Reproducción y fertilidad en roedores
TGasa 5	Ca <sup>2+</sup> y proteólisis	719 (80647)	Ubicua excepto en Sistema nervioso linfático, pero sobre todo en queratinocitos y folículos capilares	Diferenciación epidérmica
TGasa 6	Desconocida	705 (79181)	Desconocida	Desconocida
TGasa 7	Desconocida	709 (79810)	Desconocida	Desconocida
B4.2	Inactiva	690 (76878)	Glóbulos rojos, médula ósea, hígado fetal y bazo	Estructura de la membrana celular

La importancia del papel biológico de la transglutaminasa está demostrada y ya hay evidencias de que, tanto un déficit en su producción como una sobreproducción de la misma, pueden tener una potencial relación con la prevalencia de ciertas enfermedades coronarias (Sane *et al.*, 2009; Matlung *et al.*, 2012), fibrosis, diabetes (Joshi *et al.*, 2019), metástasis (Seo *et al.*, 2019), enfermedades autoinmunes, como la celiaquía (Aaron and Torsten, 2019), de la piel, como la dermatitis (Antiga *et al.*, 2019), entre otras, llegando a ser denominada como pegamento biológico de la naturaleza (Griffin *et al.*, 2002).

Las transglutaminasas (EC 2.3.2.13, proteína-glutamina  $\gamma$ -glutamyltransferasas), son proteínas con actividad enzimática, que pertenecen al grupo de las aciltransferasas. Estas enzimas, catalizan reacciones de entrecruzamiento o polimerización, de incorporación de aminos, de desamidación, de esterificación o incluso pueden mostrar actividad isopeptídica. Estas reacciones, pueden modificar las propiedades funcionales de los alimentos con matrices proteicas (Ando *et al.*, 1989; DeJong and Koppelman, 2002; Griffin *et al.*, 2002; Mariniello *et al.*, 2008; Buchert *et al.*, 2010) en términos de su peso molecular, carga, conformación y estabilidad que conduce a atributos de mayor valor añadido (Fatima and Khare, 2018).

La reacción de transamidación se produce entre los grupos  $\gamma$ -carboxiamida de la glutamina unidos a un péptido (o proteína) que actúan como donadores de grupos acilo y que reaccionan con el grupo  $\epsilon$ -amino terminal de los residuos de lisina o con aminos primarias (receptores de

grupos acilo). En el primer caso, se forman enlaces cruzados isopeptídicos intra- e intermoleculares entre la glutamina y la lisina que dan lugar a polímeros de alto peso molecular. El enlace que forma la reticulación cruzada se llama  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina (G-L). Durante la reacción, se genera una molécula de amoníaco por cada enlace entrecruzado (Figura 1.1a) y, en el segundo caso, se produce la incorporación de la amina primaria a la cadena proteica como respuesta a un cambio en la superficie hidrofóbica, formándose conjugados amina-proteína (Figura 1.1b).

En el caso de que en la matriz proteica no haya disponibles aminas primarias o residuos de lisina libre que actúen como receptores acilo, la transglutaminasa puede catalizar la desamidación hidrolítica de los residuos de glutamina usando el agua como receptor de grupos acilo, lo que provoca un incremento en el número de residuos carboxílicos que alteran la carga de la proteína y se forma ácido glutámico y amoníaco (Figura 1.1c). De manera análoga, algunas transglutaminasas son capaces de catalizar reacciones de esterificación en las que el grupohidroxilo de un alcohol actúa como aceptor del grupo acilo y generando amoníaco (Figura 1.1d).

Hay evidencias de que algunas transglutaminasas como el Factor XIIIa y la TGasa2 pueden actuar como isopeptidasas, hidrolizando los isopeptidos  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina, en este caso, sin producir amoníaco (Figura 1.1e).

El procedimiento de transferencia de grupos acilo sigue un mecanismo de reacción de doble desplazamiento o ping-pong modificado, ya que participan 2 sustratos de manera secuencial y que es muy frecuente en reacciones enzimáticas (Umezawa *et al.*, 2002). Brevemente, el grupo  $\gamma$ -carboxamida de un residuo de glutamina reacciona con la cisteína de la tríada catalítica del centro activo para formar un compuesto intermedio relativamente estable y liberando amonio; este compuesto reacciona con el segundo sustrato, una amina primaria, el grupo  $\epsilon$ -amino terminal de los residuos de lisina o una molécula de agua, formándose la unión amida, y produciéndose la hidrólisis del intermediario acilo-enzima, lo que causa la desaminación del residuo de glutamina (Mariniello *et al.*, 2008; Cadavid, 2018).



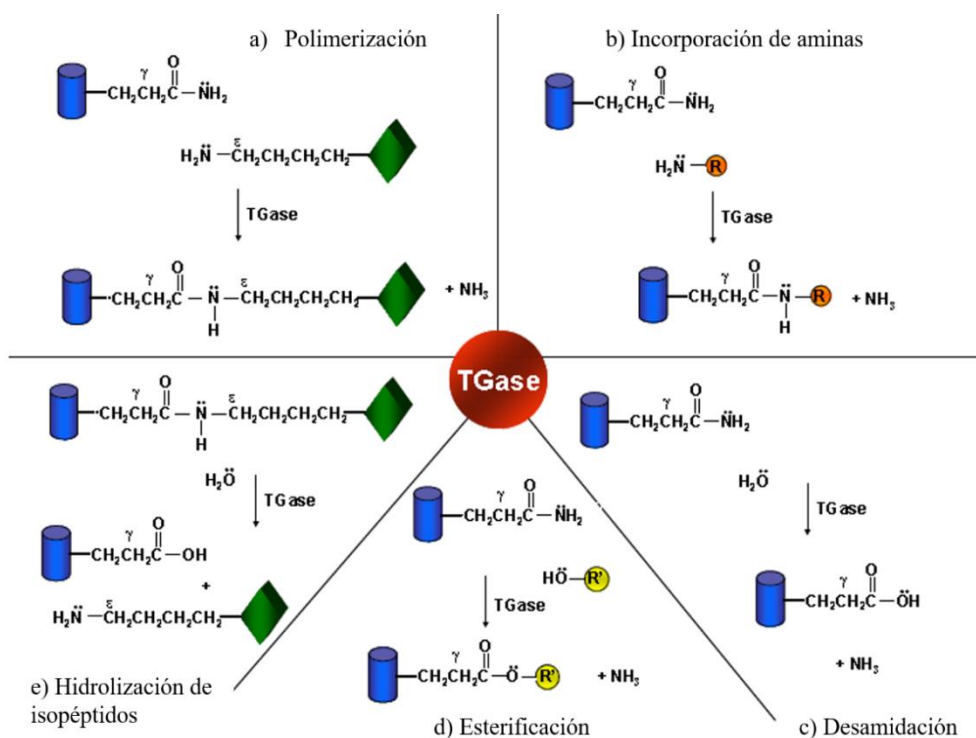


Figura 1.1. Reacciones catalizadas por la enzima transglutaminasa. (a) Reacción de polimerización o entrecruzamiento, (b) Incorporación de aminas, (c) Reacción de desamidación, (d) Reacción de esterificación y (e) Reacción de hidrolización de isopéptidos (adaptada y modificada de Mariniello *et al.*, 2008).

A diferencia de la limitada especificidad de sustrato de la glutamina (donante de grupos acilo), la transglutaminasa posee una amplia especificidad para los sustratos aceptores de acilo (Buchert *et al.*, 2010).

Las transglutaminasas presentan diferencias estructurales en función de su origen, por lo que los mecanismos que regulan su actividad varían. A pesar de ello, el mecanismo catalítico es similar y muchas de ellas requieren  $\text{Ca}^{2+}$  y el corte proteolítico para su activación (Tabla 1.1).

Los primeros estudios de aplicación a matrices alimentarias fueron llevados a cabo con transglutaminasa obtenida a partir de hígado de cobaya (Ikura and Kometani, 1980) y con plasma sanguíneo bovino (Kurth and Rogers, 1984), siendo la transglutaminasa obtenida a partir del hígado de cobaya prácticamente la única disponible comercialmente hasta principios de los años 80. El uso de ambas transglutaminasas fue muy limitado debido a la escasez de sus fuentes, rendimiento muy bajo y el elevado coste que suponía su extracción y purificación, haciendo que tuviera poco atractivo para su aplicación en la industria alimentaria. Además, las transglutaminasas eucariotas como la TGasa2 de hígado de cobaya, requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para su activación, provocando la precipitación de proteínas en matrices que contienen caseína, globulina de soja o miosina limitando su uso en este tipo de alimentos (Motoki and Kumazawa, 2000). Por otro lado, la transglutaminasa aislada de la sangre (Factor XIIIa) rara vez se usa en la industria alimentaria debido a la transferencia de su pigmentación roja a los alimentos y porque requiere para su activación una proteasa específica, la trombina (Jaros *et al.*, 2006).

Debido a estas limitaciones para su aplicación industrial, los esfuerzos de los investigadores se centran en la obtención de transglutaminasa a partir de microorganismos, obteniéndose transglutaminasas microbianas mediante la manipulación genética de *Escherichia*

*coli*, que no se llegan a comercializar debido a las barreras legales y comerciales, unidos al rechazo de la población. Aun así, conseguir aislar y purificar la transglutaminasa excretada por algunos microorganismos es la opción más prometedora, debido a que las bacterias excretan la enzima y la ruptura celular no es necesaria, facilitando de manera considerable la purificación de la misma (Jaros *et al.*, 2006; Góes-Favoni and Bueno, 2014).

Se requiere ahondar más en el modo de acción de la transglutaminasa, concretamente de la transglutaminasa microbiana (mTG), para ampliar aún más su campo de aplicación, debido a su especificidad de sustrato, ya que hasta ahora, solo existen algunos estudios para determinar el tipo de enlaces cruzados formados, inter o intra-molecular (Figura 1.2). La reacción de reticulación G-L es más rápida que la incorporación de aminas o la desamidación en cualquier sistema basado en proteínas alimentarias (Fatima and Khare, 2018), aunque con contenidos limitados de proteína y lisina en el sustrato prevalece la desamidación de los residuos de glutamina, ya que estos factores limitantes dificultan la formación de enlaces cruzados (Renzetti *et al.*, 2008).

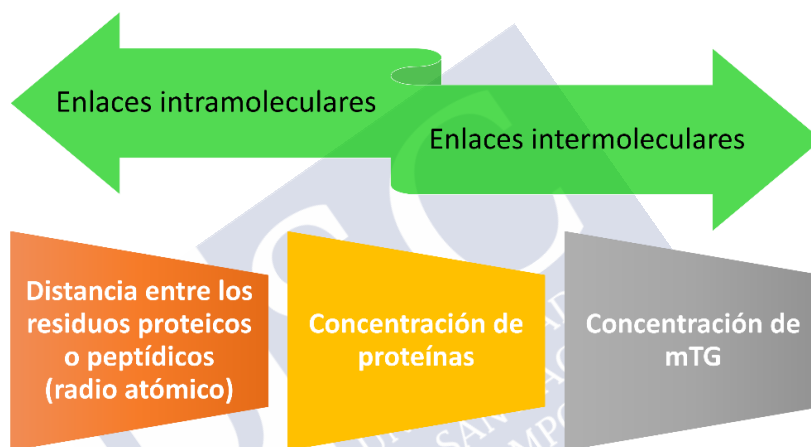


Figura 1.2. Factores que deciden el tipo de reticulación: Intra o intermolecular (adaptada y modificada de Fatima and Khare, 2018).

El planteamiento real de una potencial aplicación industrial de la transglutaminasa surge a finales de los años 80, cuando la primera transglutaminasa excretada por el microorganismo *Streptomyces mobaraensis* es aislada, purificada y caracterizada (Ando *et al.*, 1989).

La transglutaminasa es aislada posteriormente a partir de otros microorganismos (Tabla 1.2), principalmente del género *Streptomyces* y *Bacillus*, cuyas características varían debido a su origen diferente. A pesar de ser aislada en diferentes microorganismos, el mayor rendimiento se obtiene a partir de *S. mobaraensis*, por lo que constituye la mejor candidata para biosintetizar la enzima para su aplicación industrial (Kieliszek and Misiewicz, 2014), y, por tanto, sobre la que se centran los mayores esfuerzos para optimizar su producción reduciendo costes usando como medio de cultivo residuos o excedentes de la industria agroalimentaria como leche o patata (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012; Guerra-Rodríguez and Vázquez, 2014), paja de sorgo (Téllez-Luis *et al.*, 2004) o subproductos como glicerina, generada en la producción de biodiésel o la melaza de caña de azúcar (Kieliszek and Misiewicz, 2014). Hay que tener en cuenta que los costes del medio de cultivo para la fermentación suponen alrededor de un tercio de los costes totales del proceso de biosíntesis (Téllez-Luis *et al.*, 2004).

Tabla 1.2. Microorganismos productores de transglutaminasa y rendimiento en transglutaminasa microbiana (adaptada y modificada de Kieliszek and Misiewicz, 2014).

Microorganismo	Rendimiento (U·mL <sup>-1</sup> )
<i>Streptoverticilium mobaerensis</i>	0.9-3.4
<i>Streptoverticilium cinnamoneum</i>	0.3
<i>Streptoverticilium griseocarneum</i>	1.46
<i>Streptoverticilium ladakanum</i> NRRL-3191	0.28-1.55
<i>Streptoverticilium s-8112</i>	1.46
<i>Streptomyces platensis</i>	1.4
<i>Streptomyces platensis</i> M5218	0.66
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	No identificado
<i>Streptomyces lividans</i>	No identificado
<i>Streptomyces lividans</i> JT46/pAE053	2.2
<i>Streptomyces lydicus</i>	1.3
<i>Streptomyces sioyansis</i>	3.3
<i>Bacillus circulans</i> BL32	0.28
<i>Bacillus subtilis</i> spores	No identificado
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	No identificado
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	No identificado
<i>Enterobacter</i> sp. C2361	0.77
<i>Providencia</i> sp. C1112	0.92
<i>Actinomadura</i> sp. T-2	No identificado

### 1.1.2 Obtención de la transglutaminasa microbiana a partir de *S. mobaraensis*

Actualmente, la investigación sobre la producción de transglutaminasa microbiana (mTG) se centra principalmente en 3 grupos de organismos hospedadores. La mTG de tipo salvaje, que se produce utilizando *S. mobaraensis*, y que es el único producto comercial disponible hasta ahora. Aunque ya están solventados algunos de los problemas surgidos inicialmente en la obtención de la mTG recombinante expresada en *E. coli*, como son la formación de cuerpos de inclusión, bajos rendimientos y la obtención de enzima inactivo en su forma soluble, las mTG recombinantes, usando como sistemas de expresión corineobacterias (*Corynebacterium glutamicum* y *Corynebacterium ammoniagenes*) y *E. coli* (Sommer et al., 2011) no están reconocidas como sustancia segura por la FDA. También podría obtenerse mTG activa en el sistema *Streptomyces*, pero los rendimientos son inferiores a los obtenidos en la cepa salvaje. Es necesario que la ingeniería de bioprocesos y la ingeniería genética mejoren en las rutas biotecnológicas para la expresión heterogénea de la mTG, para alcanzar un sistema eficiente y sencillo para la producción "verde" de mTG (Wang et al., 2018).

La mTG de *S. mobaraensis* es sintetizada por el propio microorganismo de manera natural y es secretada en el medio de cultivo desde la membrana citoplasmática como zimógeno (protransglutaminasa) (Pasternack et al., 1998). Junto con el zimógeno son secretadas 2 enzimas (endoproteasas), la metaloproteasa activadora de la transglutaminasa (Zotzel et al., 2003a) y la tripeptidilaminopeptidasa (Zotzel et al., 2003b) que activan el zimógeno, la primera, provoca la escisión proteolítica del extremo N-terminal del propéptido en la posición de la prolina<sup>45</sup> y, la segunda, elimina un tetrapéptido N-terminal adicional (Marx et al., 2007). Pasternack et al. (1998) observan que la proenzima puede ser activada por endoproteasas exógenas, concretamente la tripsina bovina o quimotripsina y la dispasa de *Bacillus polymyxa*. Debido a que es una enzima extracelular, puede ser obtenida por fermentación tradicional (Ando et al., 1989), al no ser necesaria la disrupción celular, lo que facilita los procesos de separación y de purificación (Ando et al., 1989).

El sistema de fermentación sumergida, implica la producción por lotes y requiere aireación y agitación. Las temperaturas de operación rondan los 25-35°C y se requieren entre 2 y 4 días para que la enzima secretada por el microorganismo alcance su máxima actividad. El medio de cultivo puede contener glucosa, sacarosa, almidón, glicerol y/o dextrina como fuentes de

carbono. Las fuentes de nitrógeno, pueden ser orgánicas o inorgánicas (nitrato de amonio, sulfato de amonio, urea, nitrato de sodio, cloruro de amonio, soja, arroz, maíz, trigo, peptona, extracto de carne, caseína, aminoácidos o extractos de levadura). Para la fermentación, se requieren también minerales, como el fósforo, el magnesio, el potasio, el hierro, el cobre, el zinc, ciertas vitaminas, tensioactivos no iónicos y agentes antiespumantes. Después de la fermentación, el medio de cultivo que ya contiene la enzima excretada, se centrifuga para separar sus células, y el sobrenadante se somete a diversos procesos de purificación. La recuperación y purificación del enzima requieren una combinación de métodos para optimizar el rendimiento del proceso.

La enzima puede ser purificada mediante extracción con etanol, con acetona, con alcohol isopropílico o con cloruro de sodio. También con sulfato de amonio, mediante diálisis, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de absorción. En las enzimas comerciales, se agrega un estabilizante en forma de sales, azúcares, proteínas y surfactantes (Góes-Favoni and Bueno, 2014).

La compañía nipona Ajinomoto Co. de la mano de Enzyme Co., que en la primera década del siglo XXI empezó a producir a escala industrial la primera mTG y la comercializa bajo la marca de Activa™. Esta mTG se obtiene por fermentación de *S. mobaraensis*, contiene 100 U·g<sup>-1</sup> de producto, aunque únicamente un 1% es de enzima, siendo el 99% restante maltodextrina, que se incorpora con el objetivo de estabilizar la enzima para facilitar su manejo. Esta preparación comercial plantea algunos problemas como son la presencia de proteasas, que pueden hidrolizar las proteínas que son susceptibles de formar la reticulación. Otro inconveniente es la baja termoestabilidad de la maltodextrina libre (Sommer *et al.*, 2011).

### **1.1.3 Medida de la actividad de la transglutaminasa microbiana**

Es determinante conocer la actividad exacta de la mTG previa a su aplicación. Esto permite ajustar la dosis adecuada para obtener los resultados deseados y para optimizar costes, ya que la transglutamina puede perder actividad durante su almacenamiento. Para ello, se pueden utilizar varios métodos.

#### **1.1.3.1 Método de Grossowicz o de Folk**

El método de Grossowicz o de Folk es el primer método empleado para medir la actividad de la transglutaminasa (Grossowicz *et al.*, 1950). En este método colorimétrico se incorpora hidroxilamina en exceso que actúa como aceptor de grupos acilo que es convertida en ácido hidroxámico por la enzima en ausencia de Ca<sup>2+</sup>. El hidroxamato formado reacciona con el sustrato sintético N-carbobenzoxi-L-glutaminil-glicina (N-CBZ-Gln-Gli) que actúa como  $\gamma$ -glutamil donador dando lugar a un complejo coloreado que se mide a una absorbancia de 525 nm.

Para parar la reacción de la enzima después del tiempo de reacción se utiliza ácido tricloroacético, y la curva de calibración se prepara utilizando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato.

Una unidad enzimática de actividad de la transglutaminasa se define como la formación de 1 mol de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato por minuto a 37°C.

#### **1.1.3.2 Incorporación de la putrescina con carbono-14**

Este método patentado por Novo Nordisk A/S (2001) se basa en la incorporación de [1,4-<sup>14</sup>C]-putrescina a la N, N-dimetilcaseína, cuya reacción es catalizada por la transglutaminasa. Al cabo de 1 hora se mide la radiactividad con un contador de centelleo,

expresando cada unidad de actividad de la transglutaminasa como 1 nmol de putrescina·mg de proteína h<sup>-1</sup>.

### 1.1.3.3 Otros métodos

La actividad de la transglutaminasa puede medirse también a través de la detección enzimática del NH<sub>3</sub> generado en la reacción catalizada por la transglutaminasa. Para una medida cualitativa, se aplican métodos más sencillos, como es la variación visual del grado de gelificación de la  $\alpha$ -caseína o de la clara de huevo por la acción de la transglutaminasa comparadas con un control sin transglutaminasa (Langston *et al.*, 2007).

### 1.1.4 Estructura de la transglutaminasa microbiana

La secuenciación proteica mediante el método automatizado de Edman y la espectrometría de masas revelan que la transglutaminasa microbiana es una proteína simple, monomérica, con 331 aminoácidos (Kanaji *et al.*, 1993). Es un enzima (no una glicoproteína o una lipoproteína), aunque muestra 2 sitios potenciales de glicosilación (Motoki and Kumazawa, 2000; Yokoyama *et al.*, 2004) (Figura 1.3).

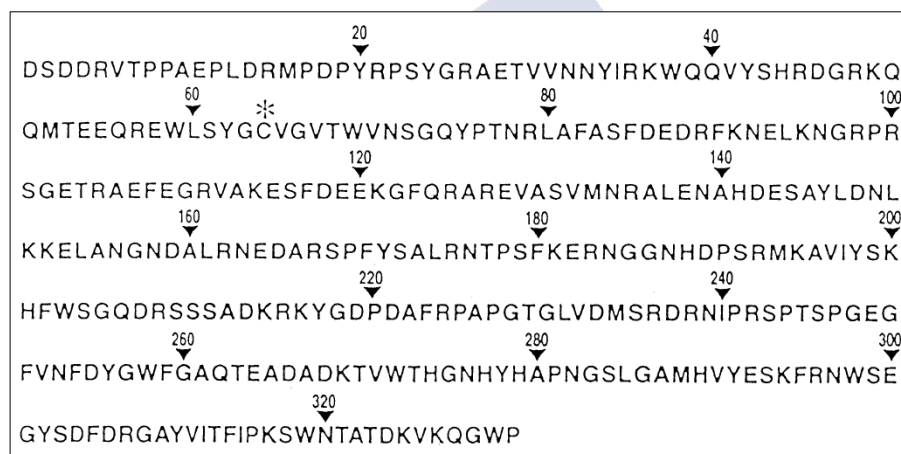


Figura 1.3. Estructura primaria de la transglutaminasa microbiana (mTG), donde los aminoácidos se nombran con códigos de 3 letras. El \* indica la posición del posible residuo activo de cisteína (adaptada y modificada de Kanaji *et al.*, 1993).

La masa molecular calculada a partir de la composición de aminoácidos es 37.842 Da, valor próximo a los 40 kDa obtenidos experimentalmente mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y cromatografía de exclusión o permeación en gel (GPC) (Ando *et al.*, 1989) y a los 37.869.2±8.8 Da obtenidos más recientemente por espectrometría de masas (Jaros *et al.*, 2006).

El análisis de hidropatía de la secuencia de mTG indica que esta enzima es bastante hidrofílica en global, aunque presenta varias regiones hidrofóbicas intercaladas en la secuencia (Kanaji *et al.*, 1993). Estas regiones hidrofóbicas parecen estar ubicadas en áreas hidrofílicas en la superficie del enzima (Motoki and Kumazawa, 2000).

La estructura secundaria está formada por 8 hebras  $\beta$  rodeadas por 11 hélices  $\alpha$  (Figura 1.4).

La estructura terciaria de la mTG tiene una estructura similar a un disco con una hendidura central, donde se encuentra ubicado el centro activo con la tríada Cis-His-Asp, concretamente el residuo de cisteína (cisteína<sup>64</sup>) con un grupo tiol, que es esencial para la actividad catalítica (Kanaji *et al.*, 1993; Kashiwagi *et al.*, 2002). El residuo catalítico por su posición y por la

flexibilidad de la estructura en la zona de la hendidura queda expuesto al medio externo de manera que hace que la enzima reaccione rápidamente con el sustrato (Yokoyama *et al.*, 2004). Este es uno de los aspectos diferenciadores con otras TGs que requieren la presencia de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  que se unan a la enzima induciendo cambios conformacionales en la molécula, liberando el residuo de tiroxina que limita la accesibilidad al residuo catalítico de cisteína quedando de esta manera lo suficientemente expuesto para la reacción enzima-sustrato (Casadio *et al.*, 1999; Shimba *et al.*, 2002). Estas diferencias estructurales, eran de esperar teniendo en cuenta que la masa molecular de la mTG alrededor de la mitad de otras TGs (90.000 Da la TG de hígado de cobaya) y que la secuencia de aminoácidos es bastante diferente.

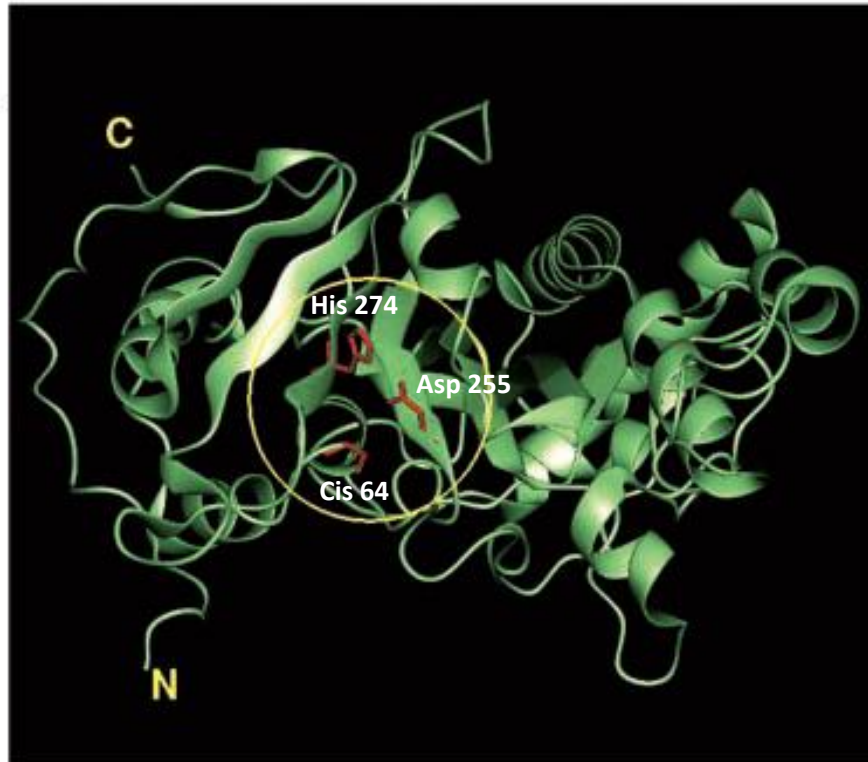


Figura 1.4. Estructura secundaria de la mTG (adaptada y modificada de Kashiwagi *et al.*, 2002).

A pesar de que la masa molecular, la secuencia de aminoácidos, el ambiente hidrofóbico y la conformación de la mTG difieren bastante de las TGs de origen animal y vegetal, la disposición de la estructura secundaria alrededor del sitio activo es similar (Kashiwagi *et al.*, 2002; Bittencourt and Arntfield, 2012). En la TG del Factor XIII, la triada catalítica está formada por una cisteína<sup>272</sup>, una histidina<sup>332</sup> y un residuo de ácido aspártico<sup>355</sup>, situándose el sitio activo cisteína<sup>272</sup> cerca del extremo N de una hélice  $\alpha$ , que está flanqueada por 4 hebras  $\beta$  que contienen histidina<sup>332</sup> y ácido aspártico<sup>335</sup>. En la molécula de mTG, la triada catalítica formada por cisteína<sup>64</sup>, ácido aspártico<sup>255</sup> e histidina<sup>274</sup> ocupan los puestos correspondientes. Debido a la posición relativa de la histidina y del ácido aspártico, éstos podrían intercambiarse por lo que parece que el ácido aspártico desempeñe el papel de la histidina en la TG del Factor XIII. Además, el ácido aspártico<sup>255</sup> es esencial en la mTG, aunque no en otras TGs. Por el contrario, histidina<sup>274</sup> podría no ser esencial en la mTG funcionando el sitio activo como una diada catalítica cisteína<sup>272</sup>-ácido aspártico<sup>255</sup> (Kashiwagi *et al.*, 2002).

### 1.1.5 Características de la mTG

El control de las variables de operación, permite modular o potenciar la acción de la mTG.

#### 1.1.5.1 pH y temperatura

El punto isoeléctrico (pI) de la mTG obtenida a partir de *S. mobaraensis* es 8.9, muy superior al de la TG de hígado de cobaya (4.5). En cuanto a la actividad relativa (Figura 1.5a), ésta es máxima a pH 6-7, aunque mantiene una actividad residual del 30% a pH 4 y 9. La rápida caída observada a pH <5 o >8, puede ser debido a la protonación y desprotonación del centro activo o debido a cambios conformacionales consecuencia de la desnaturalización de la enzima (Ando *et al.*, 1989; Motoki and Kumazawa, 2000; Eissa *et al.*, 2004; Pagani, 2015) (Figura 1.5a).

La temperatura óptima se sitúa en los 60°C (Figura 1.5b). La enzima mantiene algo de actividad residual a temperaturas próximas a la congelación y a 70°C pierde su actividad a los pocos minutos (Seguro *et al.*, 1996).

Ando *et al.* (1989) determinan que las condiciones de pH y de temperatura óptimos son 50°C y pH 6.0.

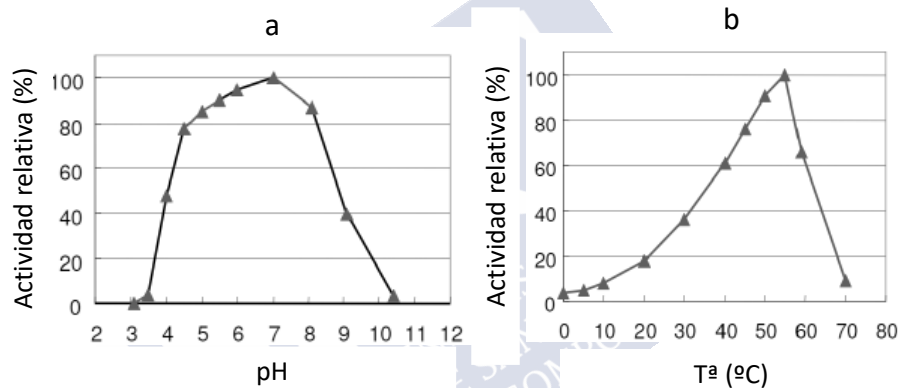


Figura 1.5. Actividad relativa (%) de la mTG comercializada por Ajinomoto© en función del pH (a) y de la temperatura (°C) (b) (adaptada y modificada de Pagani, 2015).

La mTG de *S. mobaraensis* pierde su estabilidad a pH por debajo de 5 y por encima de 9 (Figura 1.6a) y a temperaturas superiores a 60°C (Figura 1.6b). La actividad residual es casi nula después de 10 minutos a pH 7. Mantiene su actividad durante 10 minutos a 50°C, pero la pierde en un par de minutos a 70°C (Seguro *et al.*, 1996).

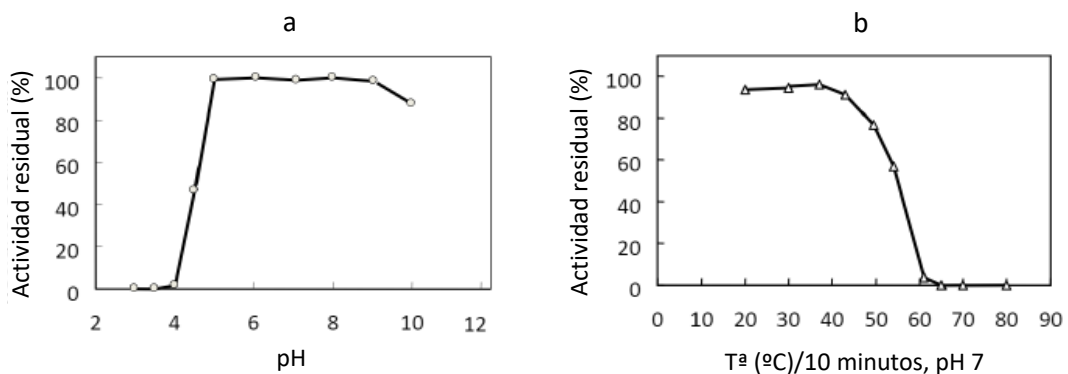


Figura 1.6. Actividad residual (%) de la mTG comercializada por Ajinomoto© en función del pH (a) y de la temperatura (b) (adaptada y modificada de Pagani, 2015).

Estos rangos de pH y temperatura pueden variar ligeramente en función del microorganismo productor, encontrándose incluso algunas diferencias entre las mTGs obtenidas a partir de diferentes *Streptomyces*. La temperatura óptima y el pH para la expresión de su máxima actividad de las mTGs procedentes de *S. lydicus*, *S. platensis* y *S. nigrescens* son los mismos que para *S. mobaerensis*, excepto que para *S. lydicus* el pH óptimo se sitúa en 2 puntos por debajo (Langston *et al.*, 2007). Para *S. hygroscopicus* las condiciones óptimas son 37-45°C y un pH en torno a 6.0-7.0 (Cui *et al.*, 2007) y para *S. libani* la temperatura óptima es 2-3°C más baja y el pH óptimo es ligeramente más alcalino. La estabilidad térmica de *S. libani* se sitúa también en temperaturas más bajas, aunque no se ha encontrado diferencias en la estabilidad con el pH (Umezawa *et al.*, 2002).

La mTG obtenida de *S. ladakanum* muestra la máxima expresión de su actividad a 40°C y a pH 5.5, aunque es estable en un rango de pH 5.0 a 7.0 (Ho *et al.*, 2000). Sin embargo, la producida por *Bacillus subtilis* muestra su óptima actividad a 60°C y un pH de 8.2 (Suzuki *et al.*, 2014). Para *Bacillus circulans* la máxima actividad se registra a pH 6.5 y a temperaturas próximas a los 40°C (Volken de Souza *et al.*, 2011).

Todos estos datos apuntan hacia una estabilidad en un amplio rango de pH y en un rango moderadamente amplio de temperaturas. Aspecto en el que difiere de las TG de origen animal como la obtenida a partir de hígado de cobaya, que a 55°C durante 10 minutos mantiene una actividad residual del 25%, mientras que en la mTG de *S. mobaraensis* en esas condiciones mantiene el 60% de actividad residual (Nury and Meunier, 1990). En cuanto al pH, la TG de hígado de cobaya muestra mayor actividad y es más estable a pH 7-8.8 a 37.5°C (Folk and Cole, 1966; Joseph *et al.*, 1994).

#### 1.1.5.2 Presión hidrostática

Otro aspecto a destacar acerca de la estabilidad de la mTG, es que a diferencia de las TG aisladas de mamíferos, demuestra ser estable frente al tratamiento con alta presión hidrostática, lo que permite la aplicación simultánea de mTG y altas presiones para modificar proteínas, como la lactoglobulina, la ovoalbúmina o algunas proteínas cárnicas que no son accesibles para la mTG bajo presión ambiental (Lauber *et al.*, 2003; Trespalacios and Pla, 2007; Fort *et al.*, 2008). Además, hay una tendencia creciente a aplicar altas presiones hidrostáticas, para la destrucción de microorganismos patógenos y alterantes que acortan la vida útil y afectan a la seguridad microbiológica y a la calidad de los alimentos, sin tener que aplicar altas temperaturas o aditivos. La ventaja de la tecnología de altas presiones frente a tratamientos térmicos intensos es que minimiza las pérdidas nutricionales (vitaminas) y sensoriales (color y aroma) que se producen con los mismos, aunque las altas presiones, puede inducir a modificaciones en las propiedades funcionales de las proteínas relacionadas con la emulsificación, formación de geles etc., que pueden solventarse o contrarrestarse con la adición de mTG.

Menéndez *et al.* (2006) llegan a la conclusión de que esta estabilidad de la mTG frente a las altas presiones es debida a que el centro activo de la mTG, que se encuentra en un dominio expandido de las láminas  $\beta$ , es muy resistente a la alta presión hidrostática debido a que las regiones con láminas  $\beta$  son incompresibles y, por tanto, más estables. La desnaturalización del enzima es provocada por la destrucción de las hélices  $\alpha$ , con la consecuente influencia sobre la estabilidad de la enzima en solución. Aunque, esta estabilidad frente a altas presiones, se ve afectada por diversos factores como por el pH o por la temperatura de trabajo. La mTG mantiene una actividad residual del 60% bajo una presión de 600 MPa durante 60 minutos a 25°C, observando que el NaCl a ciertas dosis causa desnaturalización de la mTG bajo altas presiones (Lee and Park, 2002), sin embargo, a 40°C a los 12 minutos la actividad residual es del 50%



aplicando una presión de 600 MPa, aunque si se incrementa la temperatura de trabajo a 80°C, 0.1 MPa son suficientes para alcanzar la inactivación irreversible del enzima (Menéndez *et al.*, 2006). A 200 MPa y pH 4-5 se observa una inactivación del 20% de la mTG, mientras que para llegar a esos niveles de inactivación a pH 6-7 se requieren 400 MPa, por lo que la mTG es más resistente a las altas presiones en torno al rango de su pH y temperatura óptimo (Queirós *et al.*, 2019), lo cual es coherente, ya que son los rangos de mayor estabilidad.

Además del pH, la temperatura y la presión hay que tener en cuenta que la actividad y la estabilidad del enzima puede verse afectada por factores de activación, factores inhibidores y por la especificidad del sustrato.

#### 1.1.5.3 Factores de activación

Los agentes reductores como el ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol o el glutatión (Seguro *et al.*, 1996) rompen los enlaces disulfuro, aumentando la formación de enlaces hidrófobos (Eissa and Khan, 2006). Este último, patentado por Ajinomoto Co., para su uso alimentario (Kumazawa *et al.*, 2004). De hecho, la empresa nipona comercializa 2 mTGs para productos lácteos, la Activa® MP, y la Activa® YG, ésta última incorpora glutatión en su formulación, que es un agente reductor que actúa como activador de la mTG.

La actividad de la mTG se incrementa en presencia de algunos cationes  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Seguro *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 2010). Otros como  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$ , además de favorecer su actividad, aumentan su estabilidad térmica (Kütemeyer *et al.*, 2005).

#### 1.1.5.4 Factores inhibidores

La inhibición de la actividad de la mTG se asocia con la capacidad de los mismos de reaccionar con el grupo tiol libre (-SH) del residuo de cisteína bloqueando el centro activo (Ando *et al.*, 1989), lo que respalda la idea de que el residuo de cisteína es el centro activo del enzima (Seguro *et al.*, 1996; DeJong *et al.*, 2003).

Los inhibidores naturales de la mTG parece que son escasos. Se ha identificado en la leche cruda, un inhibidor presente en la misma de manera natural, cuya masa molecular se ha estimado en 200-250 Da mediante filtración en gel. Este inhibidor es muy sensible a la temperatura, quedando inactivo a temperaturas de pasteurización (DeJong *et al.*, 2003; Bönisch *et al.*, 2006). Se requiere un grado de inactivación del inhibidor del 80% para conseguir un grado elevado de enlaces entrecruzados al añadir mTG (Bönisch *et al.*, 2006). Este inhibidor también afecta a las TGs de hígado de cobaya y al Factor XIII, por lo que no está relacionado con su estructura molecular (diferente entre TGs de mamíferos y las mTGs), sino con el centro activo, que tiene cierto paralelismo en ambos tipos de TGs (DeJong *et al.*, 2003). Este inhibidor está patentado por DeJong *et al.* (2009).

Sin embargo, existen algunos inhibidores naturales del Factor XIII identificados, como algún péptido específico (Finney *et al.*, 1997), un agente antimicrobiano (la ceruleína) producido por hongos (Tymiak *et al.*, 1993) y el ácido alutacenoico aislado también en hongos, si bien dado su origen no se encuentran en alimentos (Kogen *et al.*, 2000).

Otros inhibidores son el yodoacetato, el ácido paracloromercuribenzoico y la N-etil maleimida (Seguro *et al.*, 1996), que son tóxicos y, por lo tanto, no se pueden aplicar en los alimentos. Otro inhibidor aislado en *Aspergillus japonicus*, el trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino)butano (E-64) es identificado por (Jian *et al.*, 2000). El inhibidor obtenido de *Streptomyces lavendulae* Y-20 no bloquea la actividad de la mTG, sino que la inhibe, por competencia, al reaccionar con el sustrato, y su efecto disminuye en presencia de NaCl (Ikura *et al.*, 2014). El amonio, ralentiza la reacción, pero no desactiva la enzima (DeJong and Koppelman, 2002).

Algunos cationes, como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Li}^+$  inhiben su actividad, unos en mayor grado que otros (Seguro *et al.*, 1996), aunque en función del microorganismo productor, pueden variar ligeramente los cationes con efecto inhibitor y/o activador (Ando *et al.*, 1989; Cui *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2010).

#### 1.1.5.5 Especificidad del sustrato

La mTG muestra una menor especificidad de sustrato que las TGs de mamíferos, lo que amplía el espectro de aplicación, ya que reacciona con gran variedad de sustratos (Motoki and Seguro, 1998). La menor especificidad de sustrato y mayor velocidad de reacción observada al comparar la mTG con otras TGs se puede justificar por sus diferencias estructurales.

Para que se produzca la reacción enzima-sustrato, tan importante como el número absoluto de sitios activos en el sustrato, es que deben tener accesibilidad estérica para la enzima (Bönisch *et al.*, 2004), esto último puede solventarse incorporando agentes reductores como los citados en el apartado 1.2.5.3.

Su actividad se puede potenciar o moderar, o incluso frenar mediante el control de pH,  $T^a$ , aplicación de altas presiones, incorporando cationes, agentes reductores o inhibidores descritos a lo largo del apartado 1.2.5.

## 1.2 APLICACIONES DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

En primer lugar, la aplicación de la mTG en la industria alimentaria es segura, ya que el enlace  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina está presente en alimentos cocinados o procesados de consumo habitual, como el kamaboko, la carne de ternera, la de cerdo, el pollo o en el caviar (Seguro *et al.*, 1996). Estos alimentos poseen grandes cantidades de estos enlaces que se forman durante el cocinado, debido a la actividad catalítica de la TG endógena, ya que la elevación de la temperatura durante el cocinado induce la formación de estos enlaces, por lo que la humanidad ha estado ingiriendo estos enlaces desde el descubrimiento del fuego (Motoki and Seguro, 1998). Resultados *in vivo* con roedores sugieren que el enlace que se forma en las proteínas reticuladas se rompe y la lisina se metaboliza haciéndola biodisponible (Seguro *et al.*, 1996). Además, la mTG está reconocida como GRAS (“Generally Recognized as Safe Substance”) por la FDA (“Food and Drug Administration”).

El mantenimiento de su actividad en un amplio rango de pH y de temperaturas, unido a que soporta altas presiones, que es  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, además de su escasa especificidad de sustrato (Figura 1.7), hacen que sea una herramienta idónea para su aplicación en la industria alimentaria por su amplio espectro de aplicación, tanto para el desarrollo de nuevos productos como para mejorar los ya existentes (DeJong and Koppelman, 2002; Mariniello *et al.*, 2008) generando proteínas con nuevas propiedades funcionales (Motoki and Kumazawa, 2000). La reacción de transferencia de grupos acilo se puede usar para mejorar el valor nutricional de los alimentos, por ejemplo, se puede mejorar el contenido en ciertos aminoácidos esenciales en los que el alimento a tratar sea deficiente (Motoki and Kumazawa, 2000; Jaros *et al.*, 2006).

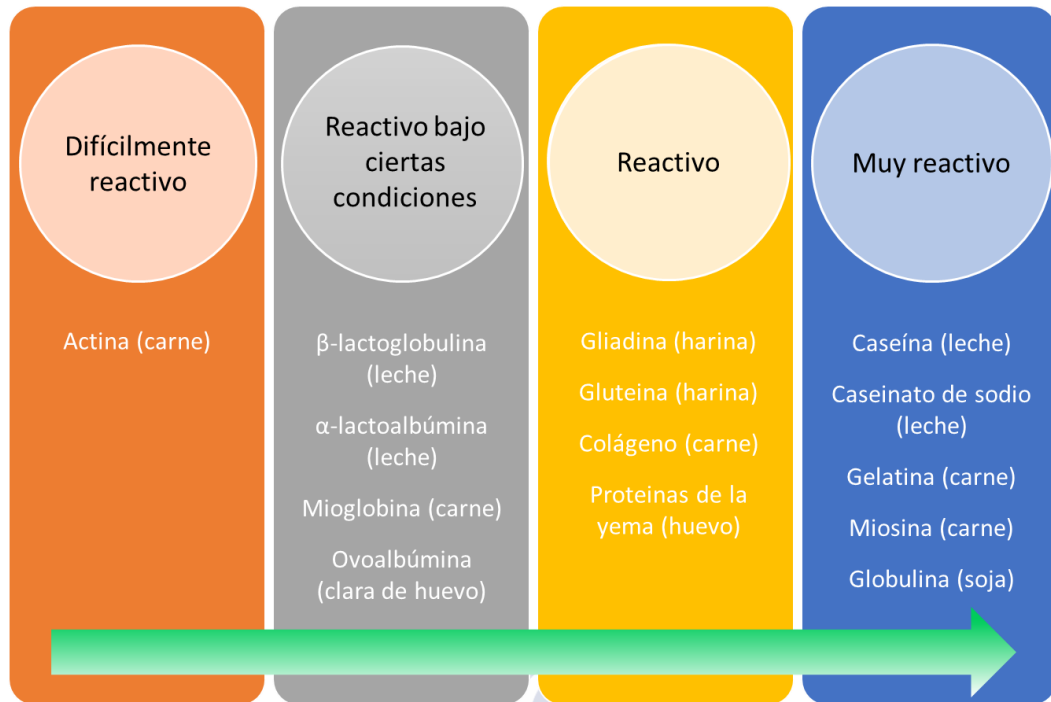


Figura 1.7. Especificidad e idoneidad de diferentes sustratos para la transglutaminasa microbiana (Barreiro and Seselovsky, 2003).

En la figura 1.8 se ofrece una visión general de la amplitud del campo de aplicación en la industria alimentaria.



Figura 1.8. Principales aplicaciones de la transglutaminasa microbiana en la industria alimentaria (adaptada y modificada de Motoki and Seguro (1998); Motoki and Kumazawa (2000); Góes-Favoni and Bueno (2014); Kieliszek and Misiewicz (2014)).

### 1.2.1 Mecanismos de acción de la mTG en las propiedades funcionales

Las propiedades funcionales de las proteínas son las propiedades físico-químicas que determinan su comportamiento en los sistemas alimentarios, lo que va a delimitar las condiciones de preparación, procesado, almacenamiento y, finalmente, de consumo, contribuyendo a la calidad y las características sensoriales de los alimentos. Características tales como el tamaño, la forma, la composición y la secuencia de aminoácidos, la carga neta de la proteína, y la distribución de dicha carga, la relación hidrofóbica/hidrofílica, las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, la flexibilidad y la rigidez de la molécula, así como la capacidad de interactuar o reaccionar con otros componentes del alimento, influyen directamente en estas propiedades (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015).

Las propiedades funcionales de las proteínas se pueden clasificar como: (i) propiedades hidrofílicas, que dependen de la interacción proteína-agua (solubilidad, capacidad de retención de agua, viscosidad, adhesividad); (ii) propiedades interfásicas o superficiales, relacionadas con su naturaleza anfifílica (emulsificación, capacidad espumante); y (iii) propiedades intermoleculares, que dependen de la capacidad de interacción, entre proteínas o entre proteínas y otras macromoléculas (gelificación y precipitación). La mTG es capaz de modificar dichas propiedades en diferentes sustratos proteicos, que se reflejan en la modificación de diferentes atributos de textura. La propiedad o propiedades que se ven afectadas va a depender de la matriz alimentaria (naturaleza del sustrato proteico), de la cantidad de enzima y de las condiciones de tratamiento (temperatura y tiempo de incubación) (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015).

#### 1.2.1.1 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas se rige por la hidrofilia y por el carácter hidrofóbico de la superficie de la proteína, que entra en contacto con el agua circundante. En general, cuanto menor sea el número de segmentos hidrofóbicos en la superficie, mayor es la solubilidad. Las propiedades físico-químicas intrínsecas de la proteína junto con las características extrínsecas del medio, como el pH, la temperatura, la fuerza iónica y los solventes orgánicos determinan la solubilidad de la misma (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015; Fatima and Khare, 2018). La mayoría de las propiedades funcionales de las proteínas se ven afectadas por la solubilidad, particularmente la emulsificación, la formación de espumas y la gelificación, que pueden verse mejoradas por la acción de la mTG (Renzetti *et al.*, 2008; Ali *et al.*, 2010; Hong and Xiong, 2012; Damodaran and Agyare, 2013).

La desamidación reduce el carácter hidrofóbico de la superficie de las moléculas de proteínas y aumenta la repulsión electrostática entre las cadenas de proteínas, lo que aumenta su solubilidad. La reacción de polimerización promovida por la mTG provoca un aumento en la carga neta negativa de la proteína, lo que favorece la disociación de los agregados de proteínas, aumentando así la solubilidad. La pérdida de grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, altera significativamente la relación hidrofóbica/hidrofílica de la superficie de la proteína. Este cambio, se refleja en el producto final, viéndose afectadas ciertas propiedades de textura como la elasticidad, la adhesividad y la masticabilidad. Estas modificaciones, se deben a que la solubilidad de las proteínas afecta directamente las propiedades funcionales de la gelificación, la emulsificación, la viscosidad, la formación de espuma y la capacidad de retención de agua, todo lo cual depende de manera crítica de las interacciones que las proteínas establecen con otras proteínas o macromoléculas que están presentes en los alimentos (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015).

### 1.2.1.2 Formación de geles

El gel se define como una fase intermedia entre los estados sólido y líquido, formada por polímeros reticulados a través de enlaces covalentes o no covalentes, que establece una red que puede retener agua u otras moléculas de bajo peso molecular. Esta es una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas en alimentos como yogur, queso, tofu o derivados del surimi, entre otros (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015). Además, dependiendo de factores como el pH, la temperatura, la solubilidad, la cantidad de proteína y la presencia de sales y otros aditivos, se pueden formar geles con diferentes propiedades y niveles de estabilidad, que influyen en las características del producto final. Los geles estables generalmente se forman en el punto isoeléctrico de la proteína, mientras que, a niveles de pH extremos, se forman geles débiles que pueden dar como resultado productos defectuosos (Grossmann *et al.*, 2017). El uso de mTG, a través de los enlaces cruzados que promueve, permite obtener geles muy elásticos y estables, adhesivos, masticables, tiernos y con menos sinéresis en diferentes sustratos, incluso a concentraciones relativamente bajas de proteínas (Motoki and Kumazawa, 2000; Damodaran and Agyare, 2013).

### 1.2.1.3 Formación de emulsiones y espumas

Las emulsiones son dispersiones de un líquido en otro líquido y pueden ser del tipo agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W). Ejemplos de alimentos que son emulsiones W/O son la margarina o la mantequilla y de O/W la mayonesa, la leche y la nata. Los helados, los merengues y las mousses, son ejemplos de alimentos que son espumas que comprenden una fase acuosa y una fase gaseosa dispersa (aire), es decir, una dispersión aire-agua (A/W). Ya sea en las emulsiones o en las espumas, las proteínas son los principales agentes tensoactivos que ayudan a la formación y estabilización de la fase dispersa. Los compuestos—para ser considerados buenos tensoactivos, deben presentar los siguientes atributos: (i) tener una rápida capacidad de adsorción interfacial; (ii) tener capacidad de desplegarse y reorientarse rápidamente en una interfaz; y (iii) al llegar a la interfaz, deben de ser capaces de interactuar con las moléculas próximas para formar una película viscoelástica fuerte y cohesiva que pueda resistir impactos térmicos y mecánicos, es decir, que sea estable (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015).

La mTG mejora las propiedades emulsionantes y espumantes, ya que la desamidación promovida por mTG, aumenta las cargas negativas y, por tanto, modifica el ratio de hidrofobicidad/hidrofilicidad de la proteína, que junto con la formación y mantenimiento de gotas más pequeñas en la interfaz agua/aceite también promovida por la acción de la enzima, reducen la tensión superficial y permite una mayor capacidad de unión al agua, incrementando la capacidad emulsionante, que puede verse afectada negativamente por la adición de sal. Con respecto a la estabilidad de la emulsión, el uso de la enzima conlleva la formación de péptidos de alto peso molecular, que se adsorben en la superficie de las gotas de aceite y promueven la repulsión electrostática, evitando la aproximación de estas gotas y, por lo tanto, la floculación, la coalescencia y la separación de fases, lo que aumenta la estabilidad de la emulsión. La capacidad espumante de las proteínas se debe a la expansión del volumen de la dispersión de proteínas cuando se incorpora el aire, al batir o agitar el alimento. La mTG mejora la capacidad de formación de espumas, debido a la rápida adsorción de péptidos en la interfaz aire-agua en su punto isoeléctrico, en el cual la repulsión electrostática es mínima. Esta rápida adsorción de péptidos provoca una rápida reducción de la tensión superficial y aumenta la interacción proteína-proteína, mejorando la capacidad de formar espumas, así como su estabilización. La desamidación es el mecanismo responsable del aumento de la adsorción de proteínas en la superficie, ya que causa una disminución en el pH y un aumento en los grupos polares que

facilitan el despliegue de proteínas en la superficie del agua (Agyare *et al.*, 2009; Rossa *et al.*, 2011).

#### 1.2.1.4 Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA) es la capacidad de la proteína para absorber agua y retenerla dentro de la matriz proteica a través de interacciones proteína-agua. La CRA, se asocia principalmente con la jugosidad y la terneza de los productos cárnicos y pesqueros. La CRA está estrechamente relacionada con las propiedades de gelificación, de emulsificación y de formación de espumas. Cuanto mayor es la concentración de la enzima, mayor es el número de enlaces cruzados de péptidos inter e intramoleculares y menor es la interacción proteína-agua. Por lo tanto, la dosis de enzima debe ser optimizada para obtener geles estables, con una mayor porosidad que permita una inmovilización eficiente del agua. Como resultado de este aumento en la CRA, se obtienen mejores propiedades de textura, tales como una mayor resistencia de la unión, rigidez, cohesión, masticabilidad y elasticidad de los geles. Con respecto a la capacidad de retención de agua de las emulsiones y espumas, la mTG aumenta la CRA. Estos cambios en la CRA se atribuyen tanto a la desamidación de los residuos de glutamina, que aumentan la hidrofilia de la proteína, como a formación de enlaces cruzados responsables de la fuerza del gel (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015; Fatima and Khare, 2018).

#### 1.2.1.5 Viscosidad

La viscosidad se relaciona con la fricción interna de un fluido o con su resistencia al flujo, incluso cuando se aplica una fuerza. El comportamiento de la viscosidad es el resultado de las complejas interacciones de las proteínas y su entorno, estas interacciones varían en función del tamaño, de la forma, de las interacciones proteína-solvente, del volumen hidrodinámico y de la flexibilidad molecular en el estado hidratado. Cuanto mayor es la concentración, la forma, el tamaño y la densidad de las moléculas en la solución, mayor es la interacción de estas moléculas, con una reducción de los espacios entre ellas, lo que resulta en una menor movilidad del agua y, por lo tanto, en una mayor viscosidad (Gaspar and De Góes-Favoni, 2015; Fatima and Khare, 2018).

La polimerización por acción de la mTG aumenta la viscosidad, lo que a su vez se relaciona también con el aumento de la resistencia del gel formado por reticulación y con la consistencia. La viscosidad de la proteína, al ser una propiedad hidrofílica, está estrechamente relacionada con la capacidad de emulsión y de gelificación (Bönisch *et al.*, 2007a; Rossa *et al.*, 2011, 2012; Gaspar and De Góes-Favoni, 2015).

### 1.2.2 Aplicaciones de la mTG en productos lácteos

#### 1.2.2.1 La leche como sustrato

Los efectos de la mTG en las proteínas de la leche han sido ampliamente estudiados. Las proteínas de la leche se clasifican en caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ), que son las mayoritarias, representando el 80% de las proteínas en la leche bovina, y en proteínas séricas ( $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina). Las primeras forman la fase micelar inestable y las segundas se encuentran en la fase soluble estable (Lucey *et al.*, 2003).

Las caseínas son un excelente sustrato para la mTG, debido a que tienen una estructura terciaria poco compacta, flexible y desordenada. Además, la  $\alpha_1$ -caseína y la  $\beta$ -caseína no contienen enlaces disulfuro. Estas características facilitan el acceso de la enzima a los grupos reactivos (Sharma *et al.*, 2002; O'Connell and DeKruif, 2003).

En la leche sin calentar, la  $\kappa$ -caseína es la más accesible para la mTG, esto se debe a que, además de una estructura que hace que el centro activo esté más accesible, la  $\kappa$ -caseína se sitúa en la zona periférica de la micela de caseína. La siguiente en reactividad con la mTG es la  $\beta$ -caseína y, finalmente, la  $\alpha$ -caseína, esto se debe a que la estructura porosa de las micelas de caseína permite el acceso de la enzima, y, aunque en el interior se encuentran tanto la  $\beta$ -caseína como la  $\alpha$ -caseína, la primera es más accesible que la segunda debido a su estructura más desordenada, flexible y abierta, lo que la hace más dinámica, pudiendo incluso “salirse” de la micela a temperatura ambiente (disociación de la micela de caseína) y, por lo tanto, es más accesible. La  $\alpha$ -caseína, forma la parte más rígida de la micela, con una estructura más ordenada y menos dinámica, lo que dificulta la accesibilidad de la mTG al centro activo (Sharma *et al.*, 2001). En el caseinato sódico, el grado de polimerización se incrementa debido a que la estructura más desordenada de las micelas de caseína favorece la polimerización, además, el orden en el grado de reactividad de las caseínas se modifica, manteniéndose la  $\kappa$ -caseína en primer lugar, seguida de la  $\alpha$ -caseína. La  $\beta$ -caseína, se posiciona como la menos reactiva de las tres (Tang *et al.*, 2005). Estos hechos confirman que, la reactividad de las caseínas en la leche cruda, se ve muy influenciada por su distribución en la micela (Hinz *et al.*, 2012). Debido a que la estructura micelar es muy influenciada por parámetros como la temperatura, el pH y el equilibrio de los minerales de la leche, la reacción con la mTG puede verse afectada al modificar estos parámetros (Hinz *et al.*, 2012; Romeih and Walker, 2017).

El precalentamiento de la leche a temperaturas alrededor de la pasteurización (85°C) mejora la polimerización de la  $\alpha$ s1-caseína, de la  $\beta$ -caseína y de la  $\kappa$ -caseína (Sharma *et al.*, 2001; Abd-Rabo *et al.*, 2010). Temperaturas más elevadas, alcanzando temperaturas del tratamiento UHT (“Ultra high Temperature”) tienen también un efecto positivo en el grado de polimerización tanto de las caseínas como del caseinato sódico por acción de la mTG (Bönisch *et al.*, 2004). De la misma manera, se puede optimizar el grado de polimerización de las caseínas mediante el tratamiento con mTG en leches no tratadas o pasteurizadas, añadiendo un agente reductor como el glutatión, aunque no tiene efecto alguno sobre los caseinatos debido a que el agente reductor mejora la reactividad de los sustratos haciendo más accesible el centro activo del mismo y, en el caso de los caseinatos, el centro activo ya está lo suficientemente expuesto (Bönisch *et al.*, 2007a). Sin embargo, la reactividad de las caseínas no se ve afectada por los tratamientos con altas presiones (Lauber *et al.*, 2001a).

Las proteínas del suero son menos susceptibles al efecto de la mTG (Sharma *et al.*, 2002). Esta escasa reactividad con la mTG se relaciona con su estructura globular compacta y estable debido a enlaces disulfuro, por lo que requieren ser modificadas provocando una desnaturalización por calor, añadiendo agentes reductores, aumentando el pH o aplicando altas presiones hidrostáticas, que permiten aumentar su reactividad (Romeih and Walker, 2017). En cuanto a la reactividad de las proteínas séricas, los diferentes estudios arrojan resultados contradictorios. Los estudios iniciales, sugerían que la  $\beta$ -lactoglobulina es un sustrato más accesible para la mTG tras aplicar un tratamiento térmico, sin embargo, la  $\alpha$ -lactoalbúmina era accesible con o sin precalentamiento (Sharma *et al.*, 2001). Esta reactividad de la  $\alpha$ -lactoalbúmina se confirma a partir de un preparado comercial de la misma, aunque la mayor reticulación por adición de mTG se relaciona con posibles modificaciones estructurales ocurridas durante la fabricación industrial incrementando la exposición del centro activo para la reacción con la mTG (Sharma *et al.*, 2002). Estudios más recientes indican que la  $\beta$ -lactoglobulina es mejor sustrato para la mTG que la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Romeih and Hamad, 2010). El tratamiento térmico puede evitarse usando dosis muy elevadas de mTG (alrededor de 50 U·g<sup>-1</sup> de proteína) (Gauche *et al.*, 2008).

La calidad de las proteínas del suero como sustratos para la mTG puede mejorarse por diferentes vías. La reactividad de la  $\beta$ -lactoglobulina mejora incorporando agentes reductores, como el ditioneitol (DTT) (no calificado como de grado alimentario) u otros menos efectivos como la cisteína y el sulfito sódico, que escinden los grupos disulfuro aumentando la exposición del centro activo y haciéndolo más accesible para la enzima (DeJong and Koppelman, 2002; Truong *et al.*, 2004). El precalentamiento y la aplicación de altas presiones también tienen un efecto positivo sobre la reactividad de la  $\beta$ -lactoglobulina y la mTG (Lauber *et al.*, 2001b; O'Sullivan *et al.*, 2002; Zhong *et al.*, 2013) que, además de incrementar los enlaces intramoleculares, también contribuyen notablemente a la creación de enlaces intermoleculares entre la caseína y las proteínas del suero (Anema *et al.*, 2005).

El pH afecta a la proteína sérica mayoritaria, la  $\beta$ -lactoglobulina, ya que a pH 8 empieza a desnaturalizarse y, dado que a ese pH la mTG mantiene cierta actividad residual, puede ser fácilmente polimerizada; sin embargo, un cambio en el pH no mejora la polimerización por mTG de la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Eissa *et al.*, 2004).

La adición de agentes quelantes, como el EDTA, mejora la reactividad de la  $\alpha$ -lactoalbúmina y la mTG. Esta proteína sérica es una proteína ligante del calcio en la leche, que, si se desliga de él, su estructura se desestabiliza haciéndola más susceptible a la polimerización por efecto de la mTG, esto puede suceder al ser "secuestrado" el  $\text{Ca}^{2+}$ , por un agente quelante o por ruptura de los enlaces hidrofóbicos, bajando el pH por debajo de 5 (Sharma *et al.*, 2002), aunque la última opción tiene el problema de que la proteína precipita (Damodaran and Agyare, 2013).

Aunque, en general, tanto el tratamiento térmico como las altas presiones sobre la leche tienen un efecto positivo sobre la polimerización con mTG de las proteínas lácteas, la aplicación de un tratamiento térmico o con altas presiones excesivo, puede tener efectos negativos sobre el grado de polimerización de las proteínas de la leche, disminuyendo el efecto de la mTG, ya que ésta es más efectiva cuando las estructuras de las proteínas están desplegadas que cuando están desnaturalizadas, posiblemente debido a la mayor accesibilidad a los residuos de lisina y/o glutamina del sustrato cuando la estructura está desplegada (Lorenzen *et al.*, 2002; Anema *et al.*, 2005).

Además de la mayor o menor idoneidad de las diferentes proteínas de la leche para formar enlaces entrecruzados con la mTG, hay que tener en cuenta que en la leche cruda de vaca, cabra y oveja hay un inhibidor endógeno de la actividad de la mTG, aunque también de la TG de hígado de cobaya y del Factor XIII. El inhibidor tiene una masa molecular de 200-250 Da y es sensible al tratamiento térmico. Debido a las diferencias estructurales y de especificidad de sustrato que hay entre estas TGs el mecanismo de inhibición probablemente está relacionado con una característica común de ambas, el residuo de cisteína del centro catalítico, de manera que el inhibidor se une al sitio activo de la cisteína evitando así que la mTG polimerice las proteínas lácteas. El inhibidor se estima que está presente en concentraciones alrededor de  $1.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que, si la concentración de mTG es muy alta, la cantidad de inhibidor no sería capaz de bloquear todos los sitios activos pudiendo observarse cierto grado de polimerización de las proteínas en leche cruda (DeJong *et al.*, 2003). El tratamiento UHT de la leche inactiva este inhibidor, que afecta negativamente al grado de polimerización de las caseínas, pero que no afecta a los caseinatos ya que se asocia a la estructura de las micelas (Bönisch *et al.*, 2006). A temperaturas más bajas, a partir de  $72^\circ\text{C}$  ya se observa cierto grado de polimerización (Sharma *et al.*, 2001; Rodríguez-Nogales, 2006), lo que es consecuencia en parte de que el inhibidor se inactiva parcialmente. Se requiere un grado de inactivación del inhibidor del 90% para que el grado de polimerización sea significativo (Bönisch *et al.*, 2006).



#### 1.2.2.2 Aplicación de la mTG en yogur: efectos y métodos de aplicación

En el Real Decreto 271/2014 se define el “yogur” o “yoghourt” como “*el producto de leche coagulada obtenido por fermentación láctica mediante la acción de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* a partir de leche o de leche concentrada, desnatadas o no, o de nata, o de mezcla de dos o más de dichos productos, con o sin la adición de otros ingredientes lácteos, que previamente hayan sufrido un tratamiento térmico u otro tipo de tratamiento, equivalente, al menos, a la pasteurización. El conjunto de los microorganismos productores de la fermentación láctica deben ser viables y estar presentes en la parte láctea del producto terminado en cantidad mínima de 1 por  $10^7$  unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro*”.

La relación entre los microorganismos que forman el cultivo iniciador o *starter* es simbiótica, ya que *S. thermophilus* inicia el desarrollo del ácido láctico a partir de la fermentación de la lactosa y crece exponencialmente hasta pH 5.5. Mientras la cepa *Lactobacillus* estimula el crecimiento de *S. thermophilus* debido a su actividad proteolítica sobre las proteínas de la leche liberando aminoácidos que *S. thermophilus* aprovecha para su crecimiento. La formación de la estructura del yogur es inducida por la coagulación isoelectrónica de las caseínas durante el proceso de fermentación.

Principalmente, hay 2 tipos de yogur, el yogur firme y el yogur batido. El yogur firme, normalmente se fermenta en el propio envase obteniéndose una textura de gel firme, por el contrario, el yogur batido se fermenta en cuba, luego se agita y se envasa. El proceso productivo del yogur firme (Figura 1.9) es similar al establecido para el yogur batido en las condiciones de operación, aunque difieren en la etapa de fermentación.

La formación de la estructura del gel, es inducida por la coagulación isoelectrónica de las caseínas durante el proceso de fermentación.

Para mejorar la estructura del yogur y evitar la sinéresis se aplican algunos procesos tecnológicos como la suplementación con leche desnatada en polvo, concentrados de proteínas séricas o caseinato sódico, para obtener un yogur sin suero, con una firmeza y viscosidad adecuadas (Wróblewska *et al.*, 2011). En ocasiones, los efectos de esta suplementación no son los deseados, presentando defectos de textura y aromas indeseables (Pereira *et al.*, 2003, 2006; Salvador and Fiszman, 2004; Coggins *et al.*, 2010; Yüksel and Erdem, 2010; Loveday *et al.*, 2013). Tanto los parámetros de textura como la ausencia de suero, además de la acidez adecuada y la presencia de compuestos aromáticos son parámetros de calidad esenciales para la aceptación del consumidor. Los yogures elaborados con leche desnatada presentan frecuentemente defectos relacionados con la textura y la presencia de suero a lo largo de su vida útil. La sinéresis puede aparecer debido a temperaturas altas de incubación, un ratio proteínas de suero/caseínas elevado, un contenido en sólidos bajo o por manipulación inadecuada durante el almacenamiento o la distribución (Lucey, 2004).

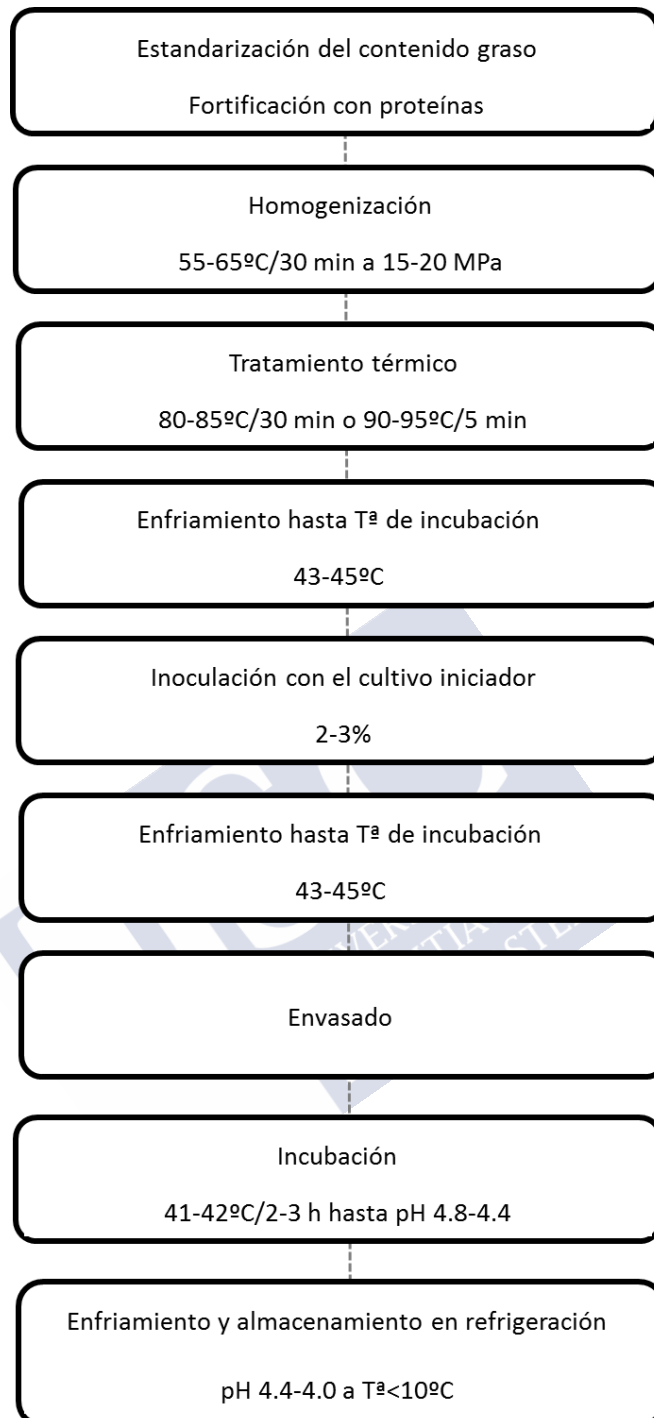


Figura 1.9. Diagrama de flujo para la fabricación de yogur firme (adaptada y modificada de Loveday *et al.*, 2013).

La incorporación de enlaces peptídicos mediante la adición de mTG se plantea como una alternativa para mejorar las propiedades texturales del yogur y evitar la sinéresis, ya que una pequeña cantidad de isopéptidos de caseína formados por entrecruzamiento intermolecular mejoran significativamente la fuerza del gel obtenido, a partir tanto de leche entera como desnatada (Lauber *et al.*, 2000).

Las dosis habituales de mTG son 0.5-3.0 U·g<sup>-1</sup> de proteína que pueden elevarse a 9.0-14.0 U·g<sup>-1</sup> en función del tipo de mTG, es decir, si la formulación contiene glutatión o de su actividad (Bönisch *et al.*, 2007a; Ardelean *et al.*, 2013; Romeih *et al.*, 2014), ya que pierde actividad a pH 5 y es completamente inactiva a pH 4.3, que es el pH de consumo del producto (Faergemand and Qvist, 1997).

La mTG puede implementarse en el proceso productivo del yogur mediante 2 métodos:

1) Adición previa a la fermentación con el cultivo iniciador: La mTG se incorpora a la leche antes de añadir el starter o cultivo iniciador y se incuba la leche con la mTG (preincubación) a 10-60°C durante 0.5-24 h. A continuación, se enfría la leche a la temperatura de inoculación y se inocula el starter. En muchos casos, la preincubación con mTG, es seguida de una etapa de calentamiento de la leche preincubada a 80-95°C, 1-10 min para inactivar la mTG antes de añadir el starter (Lorenzen *et al.*, 2002; Bönisch *et al.*, 2007a; Özer *et al.*, 2007; Iličić *et al.*, 2008, 2014; Abd-Rabo *et al.*, 2010; Yüksel and Erdem, 2010; Ardelean *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2014; Romeih *et al.*, 2014). Este método tiene como ventaja que la polimerización tiene lugar a pH constante, lo que permite variar las temperaturas y tiempos de preincubación. Por otro lado, presenta la desventaja de que el proceso productivo requiere tiempos más largos, debido a la preincubación y a la inactivación (Bönisch *et al.*, 2007a) con los costes económicos que conlleva.

Durante la prefermentación, la reticulación de las micelas de caseína debido a la actividad proeolítica de la mTG es nula o muy escasa, por lo que no se forma un gel, debido a las fuerzas de repulsión entre las capas de  $\kappa$ -caseína situadas en la superficie micelar, aunque si sufren cierta alteración en lo que se refiere a la disociación y a la desagregación de fracciones de caseína y calcio (Schorsch *et al.*, 2000). Durante el tratamiento térmico aplicado para inactivar la mTG, las proteínas del suero se desnaturalizan e interactúan con las superficies de la micela de caseína a través del intercambio de sulfhídrico de  $\kappa$ -caseína-proteína sérica y, durante la fermentación con el starter, las micelas de caseína cubiertas de proteína de suero y alteradas enzimáticamente se agregan formando la red tridimensional, es decir, el gel (Bönisch *et al.*, 2007a). Con este método de adición de la mTG los tiempos de fermentación pueden alargarse respecto a los requeridos en un control sin mTG (20-40 min) debido a una menor disponibilidad de péptidos de bajo peso molecular necesarios para el crecimiento de las bacterias del cultivo iniciador, por lo que al ralentizarse el crecimiento el proceso de acidificación se alarga (Neve *et al.*, 2001; Lorenzen *et al.*, 2002; Özer *et al.*, 2007; Iličić *et al.*, 2008), aunque este posible incremento en los tiempos requeridos para la acidificación puede no ser necesario, depende de las condiciones de operación, como la dosis y tipo de mTG o el tipo de starter, pudiendo incluso acortarse de 15 a 60 min (Bönisch *et al.*, 2007a; Iličić *et al.*, 2014).

2) Adición simultánea con el cultivo iniciador: Se añade el starter o cultivo iniciador y la mTG al mismo tiempo (Lorenzen *et al.*, 2002; Bönisch *et al.*, 2007b; Iličić *et al.*, 2008, 2014; Yüksel and Erdem, 2010; Wróblewska *et al.*, 2011). La inactivación de la mTG es gradual a medida que desciende el pH durante la fermentación, aunque puede mantenerse una actividad residual y el grado de polimerización puede ser inferior (Guyot and Kulozik, 2011). La ventaja que tiene este método es que no requiere etapas adicionales, integrándose en el proceso productivo estándar (Bönisch *et al.*, 2007b).

En general, en ambos métodos, es necesario un precalentamiento antes de la reticulación (Şanlı *et al.*, 2011), debido a la baja reactividad de la mTG en leche no calentada o pasteurizada, a pesar de que las caseínas son un buen sustrato (apartado 1.2.2.1), esto es consecuencia de la presencia del inhibidor (apartado 1.2.2.1). Esto supone la incorporación de 1 etapa previa a la adición de la mTG, para inactivar el inhibidor mediante tratamiento térmico (71-92°C/15 s-75 min) (Lorenzen *et al.*, 2002; Bönisch *et al.*, 2007b; Özer *et al.*, 2007; Iličić *et al.*, 2008, 2014),

o se puede compensar el efecto del inhibidor mediante el bloqueo químico con la adición del agente reductor glutatión (Bönisch *et al.*, 2007a). Desde un punto de vista instrumental, al añadir mTG a los yogures se estabiliza la estructura tridimensional del gel (Mohammad *et al.*, 2018), aumenta la fuerza del gel, al disminuir la permeabilidad, y aumenta la viscosidad aparente (Faergemand and Qvist, 1997; Lorenzen *et al.*, 2002; Yüksel and Erdem, 2010; Şanlı *et al.*, 2011). Los yogures también muestran una mayor firmeza, índice de viscosidad y adhesividad (Domagała *et al.*, 2013) Además, tienen una mayor capacidad de retención de agua y la sinéresis es menor, como resultado de que la red de proteínas, además de permanecer intacta durante el almacenamiento, forma una malla muy fina, con un tamaño de poro reducido en comparación con la formada en los yogures sin mTG (Figura 1.10), donde queda retenido el suero (Lorenzen *et al.*, 2002; Özer *et al.*, 2007; Domagała *et al.*, 2013). El efecto de la mTG es ligeramente más notorio cuando se realiza una adición simultánea de la mTG, pero sin diferencias lo suficientemente significativas como para considerar que un método es más efectivo que el otro.

En yogures batidos, la adición de mTG mejora la viscosidad aparente, aumenta la firmeza, la consistencia, la cohesividad y el índice de viscosidad (Milanović *et al.*, 2011; Iličić *et al.*, 2014) y evita la sinéresis (Bönisch *et al.*, 2007a; Milanović *et al.*, 2011), con un efecto más acusado cuando se realiza una adición simultánea de la mTG, excepto que la sinéresis es menor cuando la mTG se añade antes de la fermentación y se inactiva la mTG (Milanović *et al.*, 2011).

El tratamiento con mTG puede afectar al pH al inicio de la vida útil, obteniéndose yogures con un mayor pH y una menor acidez titulable que los obtenidos sin mTG y, aunque la evolución es paralela, la tendencia se mantiene a lo largo de la vida útil y es independiente del método de adición de la mTG (Lorenzen *et al.*, 2002; Özer *et al.*, 2007; Domagała *et al.*, 2013).

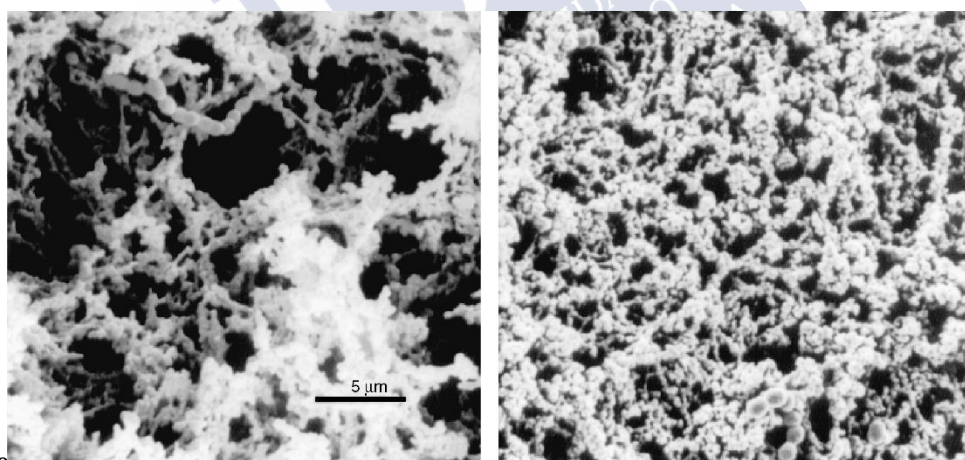


Figura 1.10. Imagen de escaneo micrográfico electrónico de la estructura de un yogur elaborado con leche sin tratar (izquierda) y la estructura de un yogur elaborado con leche incubada 2h a 40°C con mTG (derecha) (adaptada y modificada de Lorenzen *et al.*, 2002).

Desde el punto de vista sensorial, en algunos estudios se indica que los yogures con mTG tienen una menor intensidad olfativa y en boca son menos ácidos y tienen una intensidad aromática menor, aunque sin resultados concluyentes. Sin embargo, los parámetros de textura son los más afectados, ya que los yogures son claramente más firmes, más consistentes, más densos, más viscosos, más suaves, ligeramente más cremosos y, en algún caso, más granulados (Lorenzen *et al.*, 2002; Bönisch *et al.*, 2007b; Özer *et al.*, 2007; Şanlı *et al.*, 2011; Wróblewska *et al.*, 2011). La presencia de una textura granulosa (agregados de proteínas de cierto tamaño)

puede ser debida a una excesiva polimerización o a cierta actividad residual de la mTG durante el almacenamiento o puede estar asociada a un tratamiento simultáneo de fortificación con caseinato sódico (Lucey, 2004; Bönisch *et al.*, 2007b). La menor intensidad olfativa y aromática es debida al efecto de la mTG sobre el crecimiento de las bacterias del starter, sobre todo, cuando se añade mTG en concentraciones elevadas. Al ralentizar el crecimiento bacteriano se ve afectada, por lo tanto, la formación de los compuestos carbonilo (acetaldehído, diacético, acetoína, acetona, etanol y 2-butanona) y los ácidos grasos libres volátiles (ácido acético, ácido butírico y ácido caproico). El acetaldehído es el principal compuesto aromático del yogur y la relación acetaldehído/acetona es determinante para obtener un aroma equilibrado (Özer *et al.*, 2007; Routray and Mishra, 2011). A pesar de algún efecto negativo a nivel sensorial, los yogures elaborados con mTG muestran un mayor grado de aceptabilidad que los que no son tratados con la enzima, que se mantiene a lo largo de toda la vida útil, y que es superior a la de los yogures sin tratar (Özer *et al.*, 2007; Mahmood and Sebo, 2012; Domagała *et al.*, 2013).

En yogures firmes la dosis de mTG necesaria para incrementar la viscosidad es menor que la requerida para aumentar la viscosidad del yogur batido en la misma proporción, esto es debido a que durante el proceso de agitado se destruye parte de esa red tridimensional (Farnsworth *et al.*, 2006).

Los efectos de la adición de mTG en las mismas condiciones son menos notables en yogures elaborados con leche de cabra comparados con los obtenidos a partir de leche de vaca, lo cual es justificable debido al menor contenido proteico, aunque ajustando la dosis de mTG y las condiciones de operación los resultados pueden optimizarse (Farnsworth *et al.*, 2006; Ardelean *et al.*, 2012, 2013).

El efecto de la mTG sobre la firmeza del yogur aumenta al aumentar el contenido en extracto seco magro, es decir, el efecto es menor en yogures elaborados con leche entera debido a que hay una gran cantidad de glóbulos grasos “protegidos” que participan en la red tridimensional que da lugar al gel (Jaros *et al.*, 2006).

La incorporación de mTG en el yogur evita o minimiza la fortificación con proteínas, mediante la incorporación de leche en polvo, caseinato sódico, concentrados de proteínas del suero o mediante la adición de estabilizantes para conseguir una textura y firmeza adecuadas, (Iličić *et al.*, 2008; Tsevdou *et al.*, 2013; Pakseresht *et al.*, 2017) y evitar la sinéresis alargando su vida útil (Bönisch *et al.*, 2007a). En yogures desnatados se consiguen yogures con unas características comparables a las esperadas en el yogur entero (Lorenzen *et al.*, 2002).

La mTG permite reducir costes asociados a la suplementación con sólidos (Loveday *et al.*, 2013; Tsevdou *et al.*, 2013). Además, según Loveday *et al.* (2013), los consumidores consideran que el yogur es un producto natural, nutritivo y saludable, por lo que esperan que no lleven estabilizantes ni otros aditivos.

En el campo de los alimentos funcionales y de los nutraceuticos, la mTG tiene un uso potencial como material de recubrimiento para la microencapsulación de probióticos,  $\omega$ -3, antioxidantes o pigmentos naturales en yogur (Mora-Gutierrez *et al.*, 2014; Mohammad *et al.*, 2018, Tamjidi *et al.*, 2012). Por otro lado, resultados obtenidos *in vitro* sugieren que la inmunoreactividad de las proteínas del yogur elaborado con leche de vaca y tratado con mTG disminuye (Wróblewska *et al.*, 2011).

### 1.2.2.3 Aplicación de la mTG en queso: efectos y métodos de aplicación

La elaboración de queso se basa fundamentalmente en la precipitación isoeléctrica de las caseínas por adición de ácidos o cultivos iniciadores (coagulación ácida) o mediante la coagulación de las mismas por acción del cuajo u otro enzima (coagulación enzimática). Este coágulo, llamado cuajada, está constituido por un entramado de proteína, la caseína, que retiene

la materia grasa y una parte más o menos grande de la fase acuosa de la leche, el lactosuero. La cuajada puede consumirse en cuanto finaliza la elaboración, bajo la categoría de queso fresco o someterse a un proceso de maduración bajo ciertas condiciones de temperatura y humedad, en el que sufre una serie de transformaciones físico-químicas y enzimáticas como la proteólisis y lipólisis, responsables de las características organolépticas específicas de cada tipo de queso madurado. Los quesos obtenidos por coagulación ácida suelen consumirse frescos mientras que los elaborados por coagulación enzimática suelen madurarse antes de su consumo (Tamine and Robinson, 2007; Fox *et al.*, 2016).

El queso tipo “Burgos”, es un queso fresco, de pasta blanda, que originariamente se obtenía a partir de leche de oveja. Este queso, a excepción de la mayoría de quesos obtenidos por coagulación enzimática, se consume fresco, esta peculiaridad está relacionada con las características climatológicas de la zona donde se producía originariamente, Burgos, una provincia donde las temperaturas son bajas, por lo que la leche no se acidificaba tan fácilmente como en otras zonas, lo que dificultaba la coagulación ácida y, por el mismo motivo, los quesos se conservaban varios días sin ser necesaria su maduración.

En la actualidad, este queso se obtiene por coagulación enzimática de la leche de vaca pasteurizada o mezcla de vaca y oveja a la que se adicionan sales de calcio y cuajo animal, para obtener una cuajada compacta aproximadamente en media hora. Se corta la cuajada en grandes trozos, se deja reposar para que se contraiga y se decante el suero. Se coloca la cuajada en moldes donde se deja escurrir algunas horas y una vez desuerado y formado, ya se puede consumir. Además, se han incorporado las técnicas de ultrafiltración para alargar la vida útil. A pesar de este cambio en la materia prima, es el tipo de queso fresco más consumido en España (Hernando and Lluch, 2000; Timón *et al.*, 2014), aún cuando, desde el punto de vista sensorial, a los quesos frescos elaborados sin cultivos iniciadores se les considere más “planos” o con características organolépticas menos destacables en relación a otros tipos de queso (Goncu and Alpkent, 2005).

El paso indispensable en la elaboración del queso, es la coagulación de la caseína, provocada por la acción de enzimas proteolíticos y calcio, ya que gran parte de los quesos elaborados mundialmente son obtenidos por coagulación enzimática. El proceso de formación del coágulo incluye 2 etapas (Lucey *et al.*, 2003; Ramírez-López and Vélez-Ruiz, 2012).

1) En la primera, hay un proceso de hidrólisis enzimática modulada por el cuajo que desestabiliza la micela de caseína. La enzima rompe selectivamente el enlace fenilalanina<sup>105</sup>-metionina<sup>106</sup> de la  $\kappa$ -caseína, dividiendo la molécula de caseína en 2 segmentos. El primer segmento (1-105 o para- $\kappa$ -caseína) es hidrófobo, básico y permanece dentro de la micela, mientras que el segmento final (106-169 o caseinomacropéptido) que es muy hidrófilo, se libera y pasa a formar parte del lactosuero. De esta forma se produce una disminución de la electronegatividad de la micela, a la vez que desciende su grado de hidratación.

2) En la segunda etapa, la agregación de las micelas se produce por uniones electrostáticas e hidrófobas entre las micelas modificadas (para- $\kappa$ -caseína). Las micelas agregadas sufren una profunda reorganización mientras se generan enlaces para constituir el gel, a través del calcio soluble, que atrapa en su interior el suero y la materia grasa. Debido al alto grado de mineralización de la micela, al tratarse de un proceso de coagulación enzimático, el gel formado es flexible, muy cohesivo, impermeable y contráctil. Las características específicas de los distintos geles van a depender de diversos factores como son el grado de mineralización (contenido en calcio), la relación grasa/proteína o la incorporación de proteínas solubles a la matriz de caseína.

Durante siglos se ha utilizado como coagulante el cuajo animal, que contiene principalmente 2 enzimas proteolíticas, la quimosina y la pepsina, pero las dificultades para el

abastecimiento de este tipo de cuajo han favorecido el desarrollo de otros coagulantes y la optimización de algunos que se utilizaban en la producción artesanal (Jacob *et al.*, 2011; Yegin and Dekker, 2013), tanto de origen animal (camello, conejo, cordero, etc.) (Mohanty *et al.*, 1999; Rogelj *et al.*, 2001; Lilla *et al.*, 2005; Kappeler *et al.*, 2006; Bansal *et al.*, 2009; Moschopoulou, 2011; Selin *et al.*, 2018), como de origen microbiano (principalmente proteasas fúngicas) (Feijoo-Siota *et al.*, 2014) o vegetal (flores de cardo, kiwi, melón, higuera, etc.) (Sousa and Malcata, 2002; González-Rábade *et al.*, 2011; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; Shah and Mir, 2014). Los coagulantes difieren en su actividad proteolítica, y, como consecuencia, en las propiedades físicoquímicas y sensoriales del producto final (Pino *et al.*, 2009; Galán *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012; Mazorra-Manzano *et al.*, 2013).

Las propiedades físicas de los quesos frescos, es decir, la textura, la humedad y el color están directamente relacionados y son determinantes en la aceptación del consumidor. El queso fresco, se usa frecuentemente como ingrediente para ensaladas, por lo tanto, al cortar, de debe garantizar la integridad de las piezas de queso. Además, la presencia de suero durante el almacenamiento es una de las principales desventajas de este producto, que debe abordarse, ya que el exceso de sinéresis da como resultado un pequeño trozo de queso sumergido en suero, lo que hace que el queso sea mucho menos atractivo para el consumidor (Zamora *et al.*, 2012). Por lo tanto, el objetivo es obtener productos de buena calidad sensorial que se mantenga a lo largo de la vida útil al menor coste posible y la mTG se plantea como una herramienta para alcanzar estos objetivos (Ramírez-López and Vélez-Ruiz, 2012).

Las tres características principales en la fabricación de queso fresco son que, normalmente, no se utilizan “starters” o cultivos iniciadores; la salazón del queso se realiza mediante la adición de NaCl en la leche; y los granos de cuajada obtenidos después de la coagulación se vierten en moldes y se dejan escurrir sin presionar, obteniéndose unos quesos muy suaves, blancos, ligeramente salados, con un sabor poco intenso (Zamora *et al.*, 2012).

La adición de mTG puede implementarse en el proceso productivo del queso mediante 3 vías (Kuraishi *et al.*, 2001; Romeih and Walker, 2017) (Figura 1.11):

1) Añadir la mTG antes de la pasteurización (incubación previa), que tiene como consecuencia que al aplicar el tratamiento térmico la enzima se inactiva. A continuación del tratamiento térmico, se añade el coagulante y/o el “starter” (Cozzolino *et al.*, 2003; Bönisch *et al.*, 2008; Mahmood and Sebo, 2009; De Sá and Bordignon-Luiz, 2010; Domagała *et al.*, 2016).

2) Coagular la leche por adición del coagulante y/o el “starter” y, una vez formada la cuajada, incorporar la mTG (Cozzolino *et al.*, 2003; Mahmood and Sebo, 2009; De Sá and Bordignon-Luiz, 2010; Pierro *et al.*, 2010; Yüksel *et al.*, 2011; Escobar *et al.*, 2014).

3) Adicionar la mTG y el coagulante y/o el “starter” simultáneamente (Cozzolino *et al.*, 2003; Bönisch *et al.*, 2008; Mahmood and Sebo, 2009; De Sá and Bordignon-Luiz, 2010; Pierro *et al.*, 2010; Yüksel *et al.*, 2011; Özer *et al.*, 2013; Escobar *et al.*, 2014; Domagała *et al.*, 2016; Darnay *et al.*, 2017).

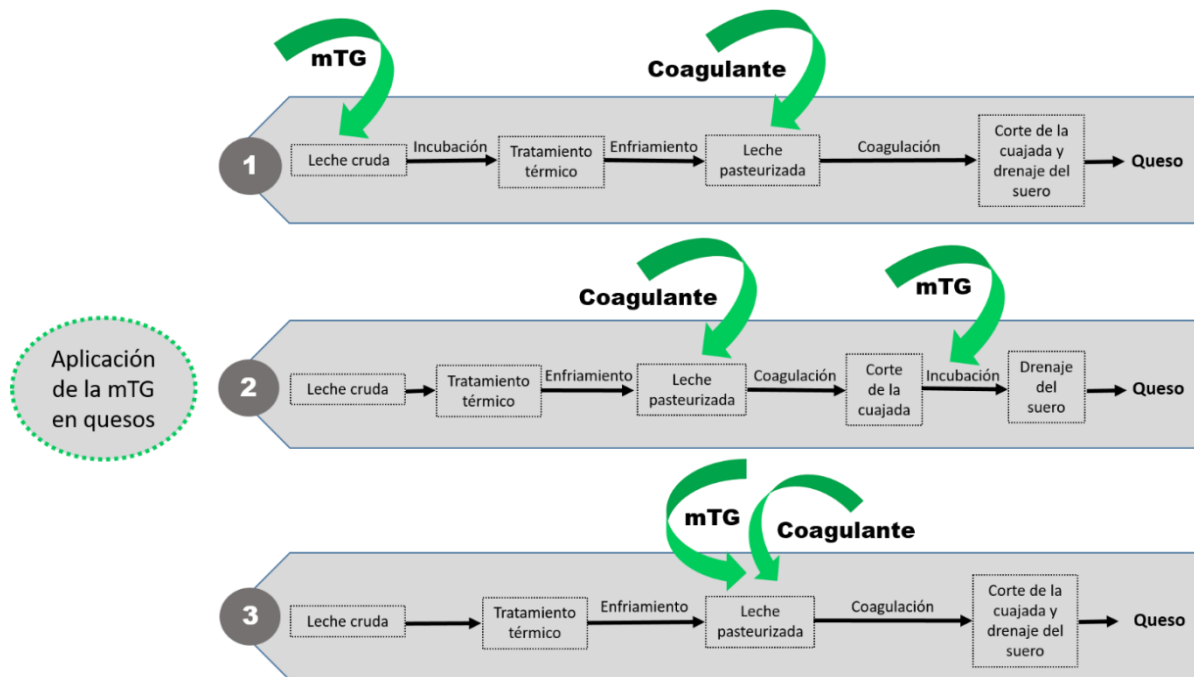


Figura 1.11. Posibles vías de adición de mTG en la producción de queso (adaptada y modificada de Romeih and Walker, 2017).

En general, la adición de mTG mejora el rendimiento quesero y disminuye la sinéresis (De Sá and Bordignon-Luiz, 2010; Aaltonen *et al.*, 2014; Escobar *et al.*, 2014; Domagała *et al.*, 2016). Aunque, en general, con la adición de mTG los tiempos de formación de la cuajada se alargan, principalmente, con la incubación previa de la mTG (Domagała *et al.*, 2016) y, en algunos casos, cuando la mTG es añadida previamente a la incorporación del cuajo, no llega a formarse la cuajada (Cozzolino *et al.*, 2003; Mahmood and Sebo, 2009; Yüksel *et al.*, 2011) o no se consigue mejorar la sinéresis (De Sá and Bordignon-Luiz, 2010).

Los mejores resultados en cuanto a rendimiento, firmeza del gel, retención de agua y menor sinéresis se obtienen con la adición posterior a la incorporación del cuajo (Cozzolino *et al.*, 2003; De Sá and Bordignon-Luiz, 2010; Pierro *et al.*, 2010; Yüksel *et al.*, 2011).

La adición simultánea permite la obtención de buenos resultados, obteniéndose quesos más duros, más elásticos y más cohesivos (Özer *et al.*, 2013) aunque hay que tener en cuenta ciertos parámetros de operación, ya que los tiempos de coagulación se alargan y la firmeza disminuye al incrementar la dosis de mTG. Por el contrario, el rendimiento quesero mejora al aumentar la dosis de mTG (Bönisch *et al.*, 2008; Özer *et al.*, 2012; Domagała *et al.*, 2016). Además de la dosis de mTG, tanto el pH como la temperatura de operación influyen en la firmeza y en el rendimiento, observando un mayor rendimiento, pero una menor firmeza a 34°C que a 30°C y una firmeza mayor a pH 6.1 que a pH 6.5 (Özer *et al.*, 2012, 2013).

Los quesos elaborados con mTG muestran una mayor aceptación a nivel sensorial (Mahmood and Sebo, 2009; Escobar *et al.*, 2014; Darnay *et al.*, 2017)

La mTG tiene un mayor potencial de aplicación en quesos blandos o semiduros, ya que en quesos duros madurados puede retardar el proceso de maduración, principalmente, cuando la mTG no se inactiva y puede mantenerse cierta actividad residual, continuando la polimerización durante el madurado (Özer *et al.*, 2012; Romeih and Walker, 2017).



El incremento del rendimiento se debe principalmente a la retención del suero en la red covalente proteica, pero también a la incorporación de proteínas del suero en la red del gel (Bönisch *et al.*, 2008).

Las diferencias en cuanto a los resultados obtenidos al añadir la mTG en diferentes etapas del proceso productivo se debe a la interferencia de la mTG en las etapas de la coagulación de la caseína, por este motivo, y por el efecto que tiene el tratamiento térmico en la coagulación de la caseína, aplicar un tratamiento térmico para mejorar la reactividad de la leche frente a la mTG puede ser contraproducente debido al efecto adverso que este tratamiento térmico puede tener en la capacidad de coagulación del queso (Bönisch *et al.*, 2008).

#### 1.2.2.4 La aplicación de la mTG en otros productos lácteos

La mTG integrada en la elaboración de otros productos fermentados como el “labneh” e inactivada por calor mejora la capacidad de retención de agua y disminuye la actividad proteolítica responsable del acortamiento de su vida útil por excesiva acidez (Dinkci, 2012).

En la obtención de leche en polvo, se puede añadir mTG a la leche e incubarla con la misma, por lo que la enzima se inactiva con el tratamiento térmico posterior. Tras someterla al proceso de secado por pulverización, permite obtener geles lácteos con una mayor viscosidad que se mantiene durante el almacenamiento (Guyot and Kulozik, 2011).

En los helados, la aplicación de la mTG mejora la textura, en relación a la dureza, suavidad, cremosidad, consistencia, resistencia a la fusión y a la formación de cristales de hielo (Gharibzahedi *et al.*, 2018; Rossa *et al.*, 2011, 2012).

### 1.2.3 Aplicaciones de la mTG en otros productos alimenticios

#### 1.2.3.1 Productos cárnicos

Las proteínas miofibrilares de la carne, la actina y la miosina son potenciales sustratos para la mTG, sobre todo, la miosina muestra una alta reactividad hacia la mTG (DeJong *et al.*, 2001). El uso de la mTG en la industria cárnica se centra sobre todo en la reestructuración de productos cárnicos (Figura 1.12) a partir de subproductos, que en la industria cárnica tienen un importante impacto económico, por lo que mediante el tratamiento con mTG se pueden poner en valor y reducir el desperdicio (Yang and Zhang, 2019). Se pueden obtener filetes tiernos y jugosos con un alto grado de aceptabilidad a partir de la adición de 1% de mTG a recortes de carne de ternera con alto contenido en grasa y, posteriormente, congelados (Sorapukdee and Tangwatcharin, 2018). La mTG tiene una ventaja sobre otras enzimas proteolíticas en productos cárnicos, ya que modifica las cadenas peptídicas mediante la formación de nuevos enlaces covalentes que revierten positivamente en una mayor ternura de los productos cárnicos tratados con esta enzima (Fatima and Khare, 2018). Aunque hay que tener en cuenta que no todos los tipos de carne son igual de aptos para la formación de enlaces cruzados mediante la mTG, por lo que se obtienen mejores resultados en la carne de ternera que en la de pollo por la cantidad de miosina (Ahmed *et al.*, 2007).

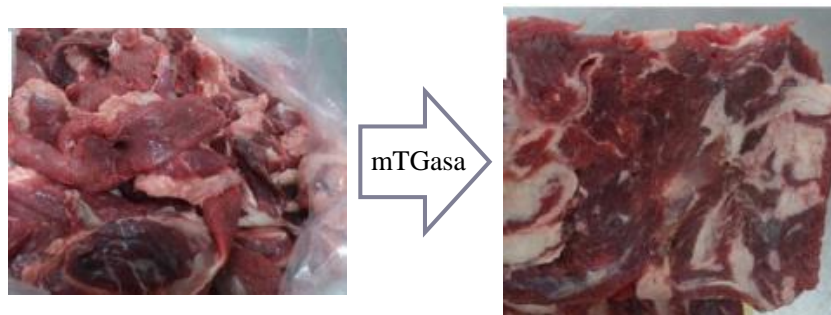


Figura 1.12. Filete de carne reestructurado a partir de carne de trozos de carne de ternera (extraída y modificada de Sorapukdee and Tangwatcharin, 2018).

### 1.2.3.2 Productos pesqueros

Los primeros productos pesqueros elaborados con transglutaminasa son los derivados del surimi (Seki, 1990). Kumazawa *et al.* (1996) purifican y caracterizan la TG  $\text{Ca}^{+2}$  dependiente presente en el abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*), principal pescado usado para la elaboración de surimi, aunque hoy en día se hace surimi a partir de diferentes especies variando entre ellas el grado de reticulación por TG endógena (Chanarat *et al.*, 2012), lo que permite mejorar las propiedades mecánicas del gel (Benjakul *et al.*, 2004; Kaewudom *et al.*, 2013) y aumentar la retención de agua (Duangmal and Taluengphol, 2010).

La mTG permite obtener productos pesqueros reestructurados a partir de carne picada de pescado con mejores características organolépticas (apariencia, olor y textura) y con una mayor vida útil que el control (Yerlikaya *et al.*, 2017). La obtención de geles resistentes a partir de carne de pescados y marisco, como cangrejo o atún, puede requerir la desnaturalización previa por calor para que la mTG sea efectiva (Martínez *et al.*, 2014; Martelo-Vidal *et al.*, 2016).

### 1.2.3.3 Productos derivados del trigo

Las principales proteínas del trigo son las del gluten, formado por gluteninas y gliadinas, aunque únicamente las gluteninas son buenos sustratos para la mTG, ya que el análisis cromatográfico confirma que las gliadinas no se ven afectadas (Seravalli *et al.*, 2011).

La mTG, añadida durante el proceso de mezclado, mejora la estabilidad de la masa de harina de trigo haciéndola más manejable y aumentando el volumen de las piezas (Boukid *et al.*, 2018) aunque no hay que excederse en la dosis de mTG, ya que un exceso de enlaces entrecruzados hace que el gluten pierda su comportamiento viscoelástico (Bauer *et al.*, 2003). Cuando se usan harinas con poca fuerza panadera, la mTG permite obtener piezas con más volumen, posiblemente debido a la capacidad de la mTG para fortalecer el gluten débil (Basman *et al.*, 2002).

Las masas de hojaldre aumentan su volumen de manera significativa (Figura 1.13), manteniéndose este efecto durante largos periodos de almacenamiento en congelación (Gerrard *et al.*, 2000).



Figura 1.13. Efecto de la mTG en masas hojaldradas (adaptada y modificada de Gerrard *et al.*, 2000).

La mTG también mejora los panes sin gluten, consiguiéndose panes más firmes, más masticables y con una mayor aceptabilidad (Gusmão *et al.*, 2019). En algunos casos, debido a que el contenido en lisina de los cereales usados para elaborar panes sin gluten, es escaso, es necesario añadir harina de alguna leguminosa para que la mTG sea efectiva (Shin *et al.*, 2010; Castillejos *et al.*, 2018). El contenido en humedad del pan puede disminuir debido a que, en ausencia de residuos de lisina, las moléculas de agua reaccionan como un nucleófilo, dando como resultado la desamidación de las glutaminas y un aumento en la capacidad de unión al agua (Castillejos *et al.*, 2018). La aplicación de la mTG en productos sin gluten requiere un estudio más pormenorizado ya que hay indicios de que el uso de la mTG en este tipo de productos puede desencadenar o agravar los problemas causados por la intolerancia al gluten en individuos con cierta predisposición genética (Loveday *et al.*, 2013).

Por otra parte, la utilización de mTG para elaborar pasta, modifica la estructura molecular de las proteínas, lo que mejora la estabilidad de la masa de manera que el producto final mantiene la firmeza y la elasticidad. Además, va a provocar una metabolización más lenta del almidón, al quedar atrapado en la matriz cerrada por la enzima, dificultando la acción de las enzimas digestivas, aunque es necesario estudiar este aspecto más en profundidad (Gharibzahedi *et al.*, 2019).

#### 1.2.3.4 Productos derivados de soja

Las globulinas 11S y 7S de la soja son excelentes sustratos para la mTG (Motoki and Kumazawa, 2000).

El tofu, un producto ampliamente consumido en Japón que tradicionalmente se prepara extrayendo la “leche” de soja y, a continuación, coagulándola mediante la adición de nigari, que es un precipitado obtenido del agua de mar rico en minerales como  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  que actúa como coagulante. El tofu tiene una textura ligera y suave, pero muy frágil, que se destruye fácilmente al aplicar el tratamiento térmico para aumentar su vida útil, aunque si el tratamiento térmico no es adecuado la vida útil se ve mermada (Motoki and Kumazawa, 2000). En la actualidad, para solventar este problema, se añade la mTG simultáneamente con el nigari, ya que permite un mayor control de la coagulación (Mariniello *et al.*, 2008) o con otros coagulantes alternativos (Chang *et al.*, 2011), mejorando la fuerza del gel y, en consecuencia, manteniendo una textura suave y ligera, sin perder firmeza, y aumentando su capacidad de retención de agua, alargando su vida útil (Nonaka *et al.*, 1996; Kuraishi *et al.*, 2001). La incorporación de mTG en el procesado de las proteínas de soja permite obtener nuevos productos como spaguetti de tofu, tofu con textura de queso, pudding de tofu, tofu frito y tofu braseado (Motoki and Kumazawa, 2000).

Además, las proteínas de soja texturizadas son ampliamente utilizadas por la industria alimentaria (Singh *et al.*, 2008) para la elaboración de diferentes alimentos como salchichas, jamón o derivados del surimi, por lo que la modificación de sus propiedades gelificantes con mTG despierta un gran interés (Kuraishi *et al.*, 2001).

No obstante, ha de tenerse en cuenta que algunos estudios inciden en que la polimerización con mTG puede disminuir la digestibilidad de ciertas proteínas de la soja (Loveday *et al.*, 2013).

#### 1.2.3.5 Films comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles se usan tradicionalmente para mejorar la apariencia y conservación de los alimentos, principalmente de frutas y verduras frescas. El creciente interés en las películas comestibles se debe a su naturaleza sostenible y al potencial de reducir el desperdicio de envases. Las películas y recubrimientos comestibles son polímeros naturales obtenidos de producciones agrícolas, tales como proteínas animales y vegetales,

gomas y lípidos, que son perfectamente biodegradables y, por lo tanto, más respetuosos con el medio ambiente (Khwaldia *et al.*, 2004).

Las películas procesadas con mTG tienen una mayor homogeneidad, presentan una superficie más lisa con mayor resistencia, menor flexibilidad y permeabilidad a los gases. Por lo tanto, la mTG es una herramienta efectiva para mejorar tanto la permeabilidad y la solubilidad como la resistencia de películas proteicas comestibles de manera que los films con mTG tienen unas propiedades y una apariencia que los hace adecuados como embalaje comestible (Falguera *et al.*, 2011; Rostamzad *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2017).

#### **1.2.4 Otras aplicaciones de la mTG**

Estudios preliminares, muestran que la mTG tiene unas potenciales aplicaciones muy prometedoras en el campo de los biomateriales y la biomedicina, ya que diversas investigaciones en ingeniería tisular muestran las ventajas de usarla frente a métodos convencionales de reticulación utilizados en ingeniería de tejidos para el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función del tejido o un órgano completo (Yung *et al.*, 2007; Zhu and Tramper, 2008).

Otro campo de aplicación a gran escala es en la industria textil, donde la mTG puede usarse como biocatalizador en la elaboración de tejidos de lana, evitando que encojan y haciéndolos más manejables. Incluso podría usarse para incorporar grupos funcionales (con aminas primarias) obteniendo novedosos acabados, o grupos con propiedades antimicrobianas, protección solar, repelentes de agua u olores (Cortez *et al.*, 2004). La enzima permite recuperar la lana y la seda dañadas durante el tratamiento químico y enzimático requerido en las diferentes etapas del procesado de las mismas. En la industria de la piel encurtida, la mTG también puede utilizarse para rellenar huecos de la piel con caseínas y gelatinas que son más económicas que otros materiales de relleno utilizados tradicionalmente (Tesfaw and Assefa, 2014). A pesar de estas prometedoras aplicaciones, se requiere incidir en el estudio de los mecanismos, para controlar la proteólisis excesiva que, de producirse, puede causar daños irreversibles en los tejidos (Cortez *et al.*, 2004).

### **1.3 ANÁLISIS SENSORIAL**

En la actualidad el análisis sensorial es considerado una ciencia y los procedimientos para llevar a cabo la evaluación sensorial están estandarizados mediante normas tanto nacionales (UNE) como internacionales (ISO).

Según las normas estandarizadas (UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010), el análisis sensorial es “*la ciencia relacionada con la evaluación de los atributos organolépticos de un producto mediante los sentidos*”. En comparación con los métodos instrumentales, la evaluación sensorial proporciona una medida real de la percepción humana (Chen and Opara, 2013).

La percepción es la toma de conciencia de los efectos de uno o múltiples estímulos sensoriales (UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010) a través de los sentidos. La concreción de estos estímulos sensoriales, son los atributos sensoriales, que son las características de un producto perceptibles por los sentidos (UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010). La percepción sensorial comienza a través de la vista, el olfato, el oído, de manera individual o simultánea, a continuación, intervienen los estímulos táctiles, a través de las manos y la boca, pero también del oído, al tocar o masticar el alimento. En la última fase, con el alimento ya en la boca, intervienen el gusto y el olfato (vía retronasal).

A través del sentido de la vista, se percibe el color, que se define como “*la sensación de tono, saturación y claridad inducida por estimulación de la retina por ondas luminosas de*

*varias longitudes de onda*”, también se perciben atributos geométricos, relacionados con la forma, el tamaño y la distribución de las partículas en el producto, otras propiedades relacionadas con las sensaciones producidas por el “contenido de agua o grasa del producto” como la humedad, presencia de grasa, etc.) y otros atributos como la turbidez, la carbonatación, la transparencia, la translucidez y la opacidad (Briz y García, 2004; UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010). Los atributos visuales son muy importantes, ya que cuando un consumidor adquiere un producto va a valorar estos atributos para aceptar o rechazar ese producto.

Mediante el sentido del olfato, por vía nasal directa se detecta el olor, que se define como *“la sensación percibida por medio del órgano olfatorio al oler ciertas sustancias volátiles”*. También, el sentido del olfato se utiliza vía nasal indirecta, cuando el producto se sitúa en la cavidad bucal, para percibir el aroma, que se define como *“el atributo sensorial perceptible por el órgano olfatorio, vía retronasal durante la degustación”* (UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010).

El sentido del gusto está localizado fundamentalmente en la lengua, en cuya superficie se encuentran varias protuberancias especializadas que se denominan papilas gustativas, que poseen botones o yemas gustativas. Años atrás, se creía que la lengua estaba segmentada en diferentes regiones que reconocían exclusivamente un sabor, pero en la actualidad se habla de zonas preferenciales, aunque no específicas, de manera que cada región de la lengua tiene un umbral diferente para cada uno de los sabores (Reed *et al.*, 2006; Smith and Margolskee, 2001). Según la UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016 (2010) se define el sabor como *“la sensación percibida por el órgano del gusto cuando es estimulado por ciertas sustancias solubles”*. En ella se incluyen 7 sabores: ácido, amargo, dulce, salado, umami, metálico y alcalino.

El sentido del oído, también participa en la percepción sensorial de los alimentos, ya que capta las vibraciones que se transmiten a través de la estructura interna del oído y que llegan al cerebro a través del nervio auditivo, cuando se fractura un alimento con las manos o al masticarlo, siendo este sonido un parámetro de calidad en diferentes alimentos, ya que mide atributos de textura asociados con la frescura o característicos de un producto (Briz y García, 2004).

El sentido del tacto se asocia a la percepción de sensaciones táctiles a través de la piel. La textura se define como *“el conjunto de todos los atributos mecánicos, geométricos, de cuerpo y de superficie de un producto perceptible a través de los receptores cinestésicos y somáticos y (si corresponde) visuales y auditivos desde el primer bocado hasta la deglución final”*.

Durante la degustación, se percibe una combinación compleja de sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales, que se denomina flavor. El flavor puede estar influenciado por sensaciones táctiles, térmicas, dolorosas y/o efectos cinestésicos (UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010).

En análisis sensorial, se diferencian 2 vertientes, la analítica u objetiva y la subjetiva o hedónica (Stone and Sidel, 1993).

### **1.3.1 Análisis sensorial analítico u objetivo**

En este caso, las características sensoriales son evaluadas de manera objetiva, sin que intervengan los gustos y preferencias de los sujetos que realizan la evaluación.

#### **1.3.1.1 Grupo de sujetos**

La evaluación sensorial es llevada a cabo por un panel de catadores entrenados, que funcionan como un verdadero equipo de medida.

El procedimiento para seleccionar y entrenar a los catadores está descrito en las normas estandarizadas de análisis sensorial (UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014, 2014). Los sujetos son preseleccionados en función de su disponibilidad, de su actitud hacia los alimentos (aversiones, impedimentos culturales, etc.), el interés, la motivación, el sentido de la responsabilidad, la capacidad de concentración, la aptitud para juzgar y la disposición para cooperar. También se deben tener en cuenta criterios de salud que puedan interferir en la percepción sensorial.

Una vez preseleccionados, se realiza la selección en base a los resultados de una serie de pruebas llevadas a cabo para identificar posibles incapacidades (anosmia, ageusia, daltonismo, etc.), determinar la agudeza sensorial y evaluar el potencial del sujeto en cuanto a su capacidad para describir y comunicar las percepciones sensoriales. Una vez seleccionados, se debe dotar a los jueces de los conocimientos elementales en los procedimientos habituales en análisis sensorial, desarrollar su capacidad para detectar, reconocer, describir y discriminar estímulos sensoriales. Para ello, se realiza en primer lugar un entrenamiento general en; el reconocimiento de olores, sabores y texturas, inicialmente con patrones y, después, con alimentos, en el uso de escalas, en el desarrollo y en el uso de descriptores y, finalmente, un entrenamiento específico con el/los productos que vaya a evaluar.

Una vez finalizado el entrenamiento, y antes de llevar a cabo la evaluación sensorial, es necesario conocer y controlar la capacidad del panel de catadores para realizar evaluaciones válidas de los atributos seleccionados del producto/-os objeto de estudio, es decir, es necesario realizar un control de la eficacia del grupo y/o de los individuos que lo forman. Esto incluye el análisis de la capacidad de un panel o de un juez para detectar, identificar y medir un atributo de forma similar a otros paneles o jueces, de discriminar entre estímulos, de utilizar la escala de forma apropiada, de repetir sus propios resultados y los de otros paneles o jueces a lo largo del tiempo. También incluye la evaluación de la concordancia entre los miembros del panel. La valoración de estos resultados permite al responsable del panel mejorar el funcionamiento del mismo, identificar los problemas y evaluar la necesidad de un reentrenamiento de algún juez en algún atributo (UNE-EN ISO 11132:2017, 2017).

#### 1.3.1.2 Lugar de realización de las pruebas

Las pruebas sensoriales se llevan a cabo en una sala de cata (Figura 1.14), que debe disponer de unas condiciones ambientales adecuadas, para que se pueda asegurar una correcta evaluación de las muestras (UNE-EN ISO 8589:2010, 2010).

Las salas de cata están diseñadas para que las pruebas sensoriales se realicen en condiciones conocidas y controladas, su disposición y condiciones ambientales están orientadas a minimizar las distracciones y reducir los efectos que los factores psicológicos y ambientales puedan tener en los juicios de los catadores. Por este motivo, deben cumplir una serie de requisitos generales: deben situarse cerca de la zona de preparación de las muestras y en una zona sin ruido, libre de olores en la medida de lo posible, con una temperatura y humedad relativa comfortable, con una decoración neutra y una iluminación regulable. Las cabinas independientes evitan las distracciones y la comunicación entre los sujetos, facilitando el trabajo individual.



Figura 1.14. Sala de cata de la Facultad de Veterinaria (Área de Tecnología de los Alimentos).

#### 1.3.1.3 Presentación de las muestras

Debe tenerse en cuenta la naturaleza de las muestras, para presentarlas en las condiciones adecuadas, de forma que sean lo más próximas posibles a las condiciones normales de evaluación (UNE-ISO 6658:2019, 2019).

El modo y orden de presentación de las muestras debe tenerse en cuenta para evitar sesgos. Las muestras deben codificarse con números aleatorios de 3 dígitos diferentes para cada prueba y deben presentarse de forma equilibrada, de manera que cada orden posible aparezca el mismo número de veces o aleatoria, en función del número de muestras o el tipo de prueba (UNE-ISO 6658:2019, 2019). En algún tipo de prueba, como en la elaboración de un perfil sensorial, si el número de catadores no es elevado, se pueden presentar réplicas de las muestras, incluso en días diferentes si es posible para aumentar la fiabilidad de los resultados (UNE-EN ISO 13299:2017, 2017). No obstante, debido a la fatiga sensorial y a los efectos de adaptación, el número de muestras evaluadas en cada sesión debe limitarse en función del tipo de prueba y producto.

Es recomendable que los catadores puedan enjuagarse con agua o algún alimento neutro entre muestra y muestra.

#### 1.3.1.4 Tipos de pruebas

Existen 3 tipos de pruebas objetivas (UNE-ISO 6658:2019, 2019):

1) Pruebas discriminativas, que permiten identificar únicamente si hay diferencias perceptibles entre muestras o entre las muestras y una referencia (UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016, 2010). Las más comunes son la prueba de comparación por parejas, la prueba triangular y la prueba dúo-trío.

2) Pruebas que utilizan escalas o categorías, que están dirigidas a decidir las categorías, clases o grados a los que se deberían asignar las muestras. También pueden expresar una estimación numérica de la magnitud de los atributos percibidos en las muestras o de la diferencia entre las mismas. Los tipos de medida son: la clasificación en categorías, la clasificación en grados, la prueba de ordenación y la clasificación con ayuda de una escala y puntuación.

3) Pruebas descriptivas, en las que los productos se caracterizan cualitativamente y cuantitativamente. En este tipo de pruebas se puede establecer el perfil cualitativo, el perfil cuantitativo, el perfil por consenso y el perfil de libre elección en base a una serie de descriptores previamente seleccionados. La selección de los descriptores para evaluar un producto debe realizarse según el procedimiento establecido en la norma UNE 87027:2018 (2018) (Figura 1.15). Se deben seleccionar muestras, de una gama de productos similares al

producto a evaluar, pero lo suficientemente diferentes, para identificar todas las posibles variaciones de las características sensoriales dentro de ese tipo de producto. En una o varias sesiones, los catadores, después de familiarizarse con los productos, propondrán una lista de términos para su descripción. Dado que generalmente el número de términos indicado por los catadores suele ser elevado, estos han de reducirse. En primer lugar, se eliminan los términos hedónicos (apetitosos, sabroso, ...), cuantitativos (fuerte, intenso, ...), términos no adecuados (olor dulce, sabor graso, ...) y los sinónimos. En una segunda fase, los catadores evaluarán la intensidad percibida para cada uno de los descriptores en diferentes productos mediante una escala estructurada de 5 puntos (1-no percibido hasta 5-fuerte). Con los datos obtenidos se calcula la media geométrica como la raíz cuadrada del producto de la frecuencia y la intensidad relativa y se establece un punto de corte, por debajo del cual se descartan esos descriptores (el método permite tener en cuenta tanto los descriptores poco citados, pero con una intensidad percibida alta como aquellos descriptores, que se perciben con poca intensidad, pero que se citan con mucha frecuencia). Finalmente, la última reducción se lleva a cabo mediante un Análisis de Componentes Principales. Una vez definida la lista de descriptores, es necesario definir la técnica de medida, las escalas a utilizar y establecer referencias para los puntos de la escala de cada uno de los descriptores, obteniéndose así la ficha de cata con la que los catadores deben entrenarse. Una vez finalizado el entrenamiento, el panel de catadores debe de validarse para asegurar la fiabilidad de sus juicios. Si los resultados de la validación son satisfactorios, se procede a utilizar la ficha de cata y establecer el perfil sensorial del alimento para el cual ha sido desarrollada. Normalmente, los descriptores, se evalúan mediante escalas lineales no estructuradas de 10 cm (UNE-ISO 4121:2006, 2006).

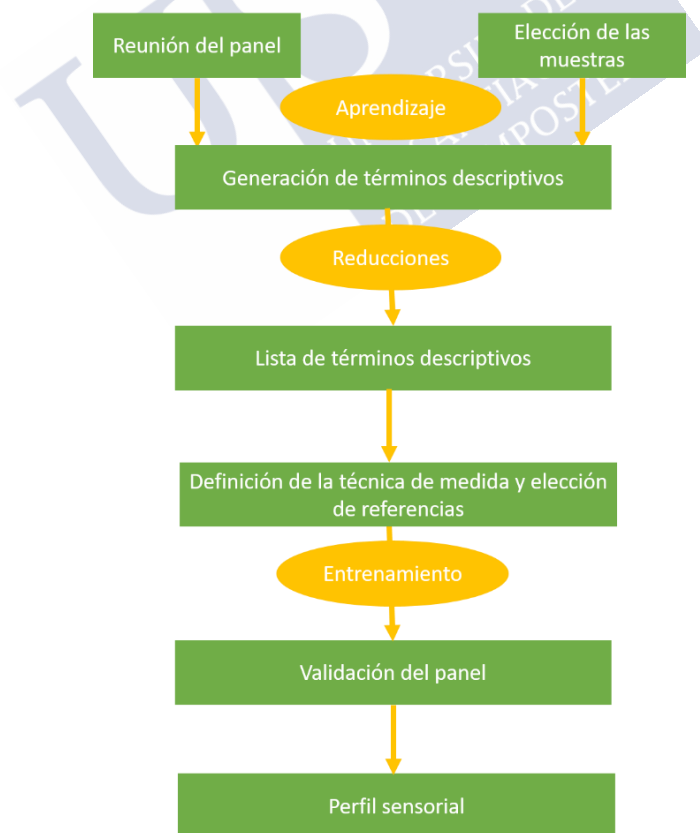


Figura 1.15. Etapas para la identificación y selección de descriptores para establecer un perfil sensorial (adaptada y modificada de UNE 87027:2018, 2018).



### 1.3.2 Análisis sensorial hedónico o estudios con consumidores

Una prueba hedónica tiene como objetivo evaluar la aceptabilidad y/o la preferencia entre 2 o más productos (UNE-EN ISO 11136:2017, 2017). Las características sensoriales, en este caso, se evalúan de manera subjetiva, ya que el objetivo es conocer los gustos y preferencias personales de los sujetos, como consumidores potenciales.

#### 1.3.2.1 Grupo de sujetos

En este caso, los productos son evaluados por consumidores potenciales del producto, sin entrenamiento previo y sin conocimientos de análisis sensorial. Se requiere un mínimo de 60 personas, aunque, en general, lo más aceptado es utilizar al menos 100 consumidores, que valoran los productos en función de sus gustos y preferencias personales. Es importante no usar los mismos consumidores de forma repetida para evaluar un mismo tipo de producto, para evitar el efecto entrenamiento (UNE-EN ISO 11136:2017, 2017).

#### 1.3.2.2 Lugar de realización de las pruebas

Las pruebas pueden realizarse en diferentes lugares, por lo que, en función de la ubicación, se clasifican en (Meilgaard *et al.*, 2016):

1) Test de laboratorio. El lugar de evaluación de las muestras es la sala de cata. Esta ubicación presenta la ventaja de que tanto la preparación como la presentación de las muestras está controlada y, como desventaja, que las muestras no son consumidas en el lugar ni en la forma habitual por parte de los participantes, lo que puede tener como consecuencia algunas desviaciones en los resultados obtenidos en el test.

2) Test central. Los lugares de evaluación son aquellos en los que se congregan los potenciales consumidores (escuelas, supermercados, centros comerciales, etc.) previa convocatoria. Este tipo de localizaciones, presentan las mismas ventajas e inconvenientes que los test de laboratorio. La principal ventaja es que la preparación y la presentación de los productos se realiza bajo condiciones controladas, y el inconveniente es que las condiciones son artificiales comparadas con el consumo normal en casa, restaurantes etc.

3) Test en domicilio. En este caso los consumidores evalúan el producto en su propio hogar, por lo que es probado en las condiciones de preparación y consumo habituales. Esto es la mayor ventaja de esta ubicación, es decir, evaluar el producto en condiciones reales de consumo. Al mismo tiempo constituye la principal desventaja, ya que, al no tener el control de la preparación y presentación, no se puede conocer si todos los consumidores evalúan el producto en las mismas condiciones. Además, el retorno de las respuestas del test es más largo y se pierden muchas respuestas, por lo que tiene un coste económico y en tiempo mayor que los anteriores.

#### 1.3.2.3 Presentación de las muestras

Los productos deben presentarse según las recomendaciones indicadas por el fabricante y en la forma y cantidad habitual de uso y consumo. La presentación de las muestras debe ser de forma anónima, identificadas únicamente por un código de 3 dígitos arbitrario (excepto cuando sea imposible enmascarar la marca o sello de calidad, o cuando se pretenda evaluar el impacto de la misma en el consumidor). En cuanto a la presentación, esta puede ser monádica estricta (el consumidor evalúa una única muestra), monádica secuencial (el consumidor evalúa las muestras de una en una, sin comparar entre ellas) y comparativa (el consumidor tiene acceso a todas las muestras objeto de estudio, lo que le permite comparar entre ellas). En la presentación monádica secuencial y en la comparativa, cada uno de los consumidores puede probar todas las muestras (diseño de bloques completos) o solo algunas de

ellas (diseño de bloques incompletos), siendo esta última opción una alternativa para evitar la fatiga cuando se desea evaluar un gran número de muestras (UNE-EN ISO 11136:2017, 2017).

#### 1.3.2.4 Tipos de pruebas

Existen 2 tipos de pruebas hedónicas cuantitativas:

1) Test de preferencia, cuyo objetivo es saber si los consumidores prefieren una muestra sobre otra, o establecer un orden de preferencia (ranking de preferencia) cuando se evalúan varias muestras, pudiendo incluir en el cuestionario una sección para comentarios, con el objetivo de conocer la causa de esa preferencia (Anzaldúa-Morales, 1994).

2) Test de aceptación, que se realizan cuando se desea obtener información de cuánto gusta o disgusta un alimento, en función de un atributo individual (color, olor, etc.) y/o en global (Meilgaard *et al.*, 2016).

Para evaluar la aceptación de los atributos sensoriales hedónicos, normalmente, se utilizan escalas estructuradas, (Anzaldúa-Morales, 1994), que pueden ser gráficas o semánticas, en las que se establece en cada punto algún tipo de identificación del grado de aceptación o rechazo. Es frecuente utilizar escalas de 9 puntos, que van desde 1-me disgusta muchísimo a 9-me gusta muchísimo, aunque también se utilizan escalas de 5 puntos, de 7 puntos e, incluso, de 11 puntos (Jaeger and Cardello, 2009; Lawless *et al.*, 2010; Lim, 2011).

La aplicación del análisis sensorial, tanto con catadores entrenados como con consumidores, es muy frecuente en yogures (Salvador and Fiszman, 2004; De Campo *et al.*, 2019). En quesos, el análisis sensorial con catadores tiene una amplia trayectoria (Bárcenas *et al.*, 2000; Bárcenas *et al.*, 2004; Elortondo *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2019), al igual que la evaluación hedónica por parte de los consumidores (Bárcenas *et al.*, 2000; Bárcenas *et al.*, 2004; Borges *et al.*, 2019).

Las técnicas sensoriales combinadas con técnicas físico-químicas y de textura instrumental permiten aumentar la eficiencia y precisión en la caracterización de los productos (Salvador and Fiszman, 2004; Chen and Opara, 2013).

### 1.4 MEDIDA INSTRUMENTAL DE LA TEXTURA

La medida instrumental de la textura se realiza mediante analizadores de textura. El analizador de textura (TA) (Stable Micro Systems Ltd.) es uno de los más utilizados. Los modelos TA-XT2i, TA-XT2 y TA.XT plus (Figura 1.16) son adecuados tanto para uso académico como industrial (Chen and Opara, 2013).

Con estos analizadores se realiza el análisis del perfil de textura (TPA). Este análisis, que se basa en la imitación del proceso de masticación, se realiza con ciclos de doble compresión. Para alimentos de forma irregular, la muestra debe cortarse con el mismo tamaño y forma para todas las evaluaciones. A través de las pruebas de TPA, se puede analizar una amplia gama de propiedades de textura de los alimentos, tales como la dureza, la elasticidad, la cohesividad, la adhesividad y la masticabilidad, entre otras. Por lo tanto, el análisis TPA representa una opción adecuada para caracterizar la textura de los alimentos sólidos o semisólidos.



Figura 1.16. Analizador de textura TA.XT plus.

La medida instrumental de la textura es muy frecuente en el yogur. Por lo tanto, la caracterización reológica del yogur es necesaria para el desarrollo del producto, de manera que se garantice la aceptabilidad del consumidor (Oroian et al., 2011).

Normalmente, en la medida instrumental del yogur, se evalúan 4 parámetros. El área positiva de la curva hasta el punto de firmeza representa la consistencia (g·s), el pico de la fuerza positiva representa la firmeza (g), mientras que la fuerza negativa máxima y el área negativa durante el retorno de la sonda representan la cohesividad (g) y el índice de viscosidad (g·s), respectivamente (Oroian et al., 2011).

En queso, se mide la dureza, la adhesividad, la elasticidad, la cohesividad y la masticabilidad (Ganesan et al., 2014). La dureza (g) se mide como la fuerza a la máxima altura en la primera compresión. La adhesividad (g·s) se mide como el área negativa de la curva del gráfico de compresión. La elasticidad se calcula como la altura en la segunda compresión dividida por la altura del primer pico. La cohesividad se calcula como la relación de las áreas del segundo y el primer pico. La masticabilidad (g) se calcula como el producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad (Castro-Briones et al., 2009; Nishinari et al., 2013; Borges et al., 2019).

## 1.5 BIBLIOGRAFÍA

Aaltonen, T., Huuonen, I. & Myllärinen, P. (2014). Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. *International Dairy Journal*, 38, 179-182.

Aaron, L. & Torsten, M. (2019). Microbial transglutaminase : A new potential player in celiac disease. *Clinical Immunology*, 199, 37-43.

Abd-Rabo, F., El-Dieb, S., Abd-El-Fattah, A. & Sakr, S. (2010). Natural State Changes of cows' and buffaloes' milk proteins induced by microbial transglutaminase. *Journal of American Science*, 6, 612-620.

Agyare, K.K., Addo, K. & Xiong, Y.L. (2009). Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloids*, 23, 72-81.

Ahhmed, A.M., Kawahara, S., Ohta, K., Nakade, K., Soeda, T. & Muguruma, M. (2007). Meat Science Differentiation in improvements of gel strength in chicken and beef sausages induced

by transglutaminase. *Meat Science*, 76, 455-462.

Ali, N.A., Ahmed, S.H., Mohamed, E.A., Ahmed, I.A.M. & Babiker, E.E. (2010). Effect of transglutaminase cross linking on the functional properties as a function of nacl concentration of legumes protein isolate. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 7, 12-20.

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.

Anema, S.G., Lauber, S., Lee, S.K., Henle, T. & Klostermeyer, H. (2005). Rheological properties of acid gels prepared from pressure- and transglutaminase-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*, 19, 879-887.

Antiga, E., Maglie, R., Quintarelli, L., Verdelli, A. & Bonciani, D. (2019). Dermatitis Herpetiformis. *Novel Perspectives. Frontiers in Immunology*, 10, 1-17.

Anzaldúa-Morales, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Ed. Acribia. Zaragoza. ISBN 84-200-0767-6.

Ardelean, A.I., Jaros, D. & Rohm, H. (2013). Influence of microbial transglutaminase cross-linking on gelation kinetics and texture of acid gels made from whole goats and cows milk. *Dairy Science and Technology*, 93, 63-71.

Ardelean, A.I., Otto, C., Jaros, D. & Rohm, H. (2012). Transglutaminase treatment to improve physical properties of acid gels from enriched goat milk. *Small Ruminant Research*, 106, 47-53.

Bansal, N., Drake, M.A., Piraino, P., Broe, M.L., Harboe, M., Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (2009). Suitability of recombinant camel (*Camelus dromedarius*) chymosin as a coagulant for Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 19, 510-517.

Bárceñas, P., Pérez-Elortondo, F.J. & Albisu, M. (2000). Selection and screening of a descriptive panel for ewes milk cheese sensory profiling. *Journal of Sensory Studies*, 15, 79-99.

Bárceñas, P., Pérez Elortondo, F.J. & Albisu, M. (2004). Projective mapping in sensory analysis of ewes milk cheeses: A study on consumers and trained panel performance. *Food Research International*, 37, 723-729.

Barreiro, F.J. & Seselovsky, R. (2003). Usos de la transglutaminasa en la industria alimentaria. *Elaboración de carne reconstituida. Invenio*, 6, 157-164.

Barros Soares, L.H. De, Assmann, F. & Záchia Ayub, M.A. (2003). Purification and properties of a transglutaminase produced by a *Bacillus circulans* strain isolated from the Amazon environment. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 295-299.

Basman, A., Köksel, H. & Ng, P.K.W. (2002). Effects of increasing levels of transglutaminase on the rheological properties and bread quality characteristics of two wheat flours. *European Food Research and Technology*, 215, 419-424.

Bauer, N., Koehler, P., Wieser, H. & Schieberle, P. (2003). Studies on Effects of Microbial Transglutaminase on Gluten Proteins of Wheat. II. Rheological properties. *Cereal Chemistry*, 80, 787-790.

Benjakul, S., Visessanguan, W. & Pecharat, S. (2004). Suwari gel properties as affected by transglutaminase activator and inhibitors. *Food Chemistry*, 85, 91-99.

- Bittencourt, F. & Arntfield, S. (2012). Use of transglutaminases in foods and potential utilization of plants as a transglutaminase source-Review. *Biotemas*, 25, 1-11.
- Bönisch, M.P., Heidebach, T.C. & Kulozik, U. (2008). Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids*, 22, 288-297.
- Bönisch, M.P., Huss, M., Weitzl, K. & Kulozik, U. (2007a). Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *International Dairy Journal*, 17, 1360-1371.
- Bönisch, M.P., Huss, M., Lauber, S. & Kulozik, U. (2007b). Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocolloids*, 21, 585-595.
- Bönisch, M.P., Lauber, S. & Kulozik, U. (2004). Effect of ultra-high temperature treatment on the enzymatic cross-linking of micellar casein and sodium caseinate by transglutaminase. *Journal of Food Science*, 69, 398-404.
- 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, 669-678.
- Borges, J. V, Souza, J.A. de, Fagnani, R., Nobre Costa, G. & Sifuentes dos Santos, J. (2019). Reduced-fat Frescal sheep milk cheese with inulin: a first report about technological aspects and sensory evaluation. *Journal of Dairy Research*, 86, 368-373.
- Boukid, F., Carini, E., Curti, E., Bardini, G., Pizzigalli, E. & Vittadini, E. (2018). Effectiveness of vital gluten and transglutaminase in the improvement of physico-chemical properties of fresh bread. *LWT-Food Science and Technology*, 92, 465-470.
- Briz, J. y García, R. (2004). *Análisis Sensorial De Productos Alimentarios: Metodología y Aplicación a Casos Prácticos*. 2ª edición. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica. ISBN 84-491-0486-6.
- 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). Crosslinking food proteins for improved functionality. *Annual review of food science and technology*, 1, 113-38.
- Cadavid Tobón, A.M. (2018). *Aplicación de la transglutaminasa microbiana en quesos frescos de coagulación ácida y enzimática*. Tesis Doctoral. Universidad de Girona.
- Casadio, R., Polverini, E., Mariani, P., Spinozzi, F., Carsughi, F., Fontana, A., Laureto, P.P. De, Matteucci, G. & Bergamini, C.M. (1999). The structural basis for the regulation of tissue transglutaminase by calcium ions. *European Journal of Biochemistry*, 262, 672-679.
- Castillejos, G.R., Ortega, C.L., Perez, A.G., Garcia, N.M. & Salazar, R.R. (2018). Effects of transglutaminase on the proximal and textural properties of gluten-free bread of sorghum and. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 32, 188-201.
- Castro-Briones, M., Calderón, G.N., Velázquez, G., Salud-Rubio, M., Vázquez, M. & Ramírez, J.A. (2009). Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 221-234.
- Chanarat, S., Benjakul, S. & H-kittikun, A. (2012). Comparative study on protein cross-linking and gel enhancing effect of microbial transglutaminase on surimi from different fish. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 844-852.
- Chang, Y., Shiau, S., Chen, F. & Lin, F. (2011). Effect of microbial transglutaminase on the

rheological and textural characteristics of black soybean packed tofu coagulating with Agar. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1107-1112.

Chen, L. & Opara, U.L. (2013). Texture measurement approaches in fresh and processed foods - A review. *Food Research International*, 51, 823-835.

Clarke, D.D., Mycek, M.J., Neidle, A. & Waelsch, H. (1959). The incorporation of amines into protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 79, 338-354.

Coggins, P.C., Rowe, D.E., Wilson, J.C. & Kumari, S. (2010). Storage and temperature effects on appearance and textural characteristics of conventional milk yogurt. *Journal of Sensory Studies*, 25, 549-576.

Cortez, J., Bonner, P.L.R. & Griffin, M. (2004). Application of transglutaminases in the modification of wool textiles. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 64-72.

Cozzolino, A., Pierro, D., 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.

Cui, L., Du, G., Zhang, D., Liu, H., & Chen, J. (2007). Purification and characterization of transglutaminase from a newly isolated *Streptomyces hygroscopicus*. *Food chemistry*, 105, 612-618.

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, 12-18.

Darnay, L., Králik, F., Oros, G., Koncz, Á. & Firtha, F. (2017). Monitoring the effect of transglutaminase in semi-hard cheese during ripening by hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 196, 123-129.

De Campo, C., Queiroz Assis, R., Marques da Silva, M., Haas Costa, T.M., Paese, K., Stanisçuaski Guterres, S., Oliveira Rios, A. de & Hickmann Flôres, S. (2019). Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. *Food Chemistry*, 301, 125230.

DeJong, G.A.H., Boumans, J.W.L. & Wijngaards, G. (2009). Food grade transglutaminase inhibitor and uses thereof (Patente US7491410 B).

DeJong, G.A.H. & Koppelman, S.J. (2002). Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. *Journal of Food Science*, 67, 2798-2806.

DeJong, G.A.H., Wijngaards, G., Boumans, H., Koppelman, S.J. & Helsing, M. (2001). Purification and Substrate Specificity of Transglutaminases from Blood and *Streptovorticillium mobaraensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3389-3393.

DeJong, G.A.H., Wijngaards, G. & Koppelman, S.J. (2003). Transglutaminase inhibitor from milk. *Journal of Food Science*, 68, 820-825.

De Sá, E.M.F. & Bordignon-Luiz, M.T. (2010). The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 243-251.

Dinkci, N. (2012). The Influence of Transglutaminase Treatment on Functional Properties of Strained Yoghurt. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11, 2238-2246

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.

Domagała, J., Wszolek, M., Tamime, A.Y. & Kupiec-Teahan, B. (2013). The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research*, 112, 154-161.

Duangmal, K. & Taluengphol, A. (2010). Effect of protein additives, sodium ascorbate, and microbial transglutaminase on the texture and colour of red tilapia surimi gel. *Food Science and Technology*, 45, 48-55.

Eissa, A.S., Bisram, S. & Khan, S.A. (2004). Polymerization and Gelation of Whey Protein Isolates at Low pH Using Transglutaminase Enzyme. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52, 4456-4464.

Eissa, A.S. & Khan, S.A. (2006). Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. *Food Hydrocolloids*, 20, 543-547.

Elortondo, F.J.P., Ojeda, M., Albisu, M., Salmerón, J., Etayo, I. & Molina, M. (2007). Food quality certification: An approach for the development of accredited sensory evaluation methods. *Food Quality and Preference*, 18, 425-439.

Escobar, D., Arcia, P., Curutchet, A., Pelaggio, R., Urrestarazu, P. & Márquez Romero, R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Innotec*, 9, 24-30.

Facchiano, A. & Facchiano, F. (2009). Transglutaminases and their substrates in biology and human diseases: 50 Years of growing. *Amino Acids*, 36, 599-614.

Faergemand, M. & Qvist, K.B. (1997). Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloids*, 11, 287-292.

Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A. & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*, 22, 292-303.

Farnsworth, J.P., Li, J., Hendricks, G.M. & Guo, M.R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65, 113-121.

Fatima, S.W. & Khare, S.K. (2018). Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry. *Microbiological Research*, 215, 7-14.

Feijoo-Siota, L., Blasco, L., Rodríguez-Rama, J.L., Barros-Velázquez, J., Miguel, T. De, Sánchez-Pérez, A. & Villa, T.G. (2014). Recent patents on microbial proteases for the dairy industry. *Recent Advances in DNA and Gene Sequences*, 8, 44-55.

Finney, S., Seale, L., Sawyer, R.T. & Wallis, R.B. (1997). Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech *Haementeria ghilianii*. *Biochemical Journal*, 324, 797-805.

Folk, J.E. & Cole, P.W. (1966). Temperature and pH affect transglutaminase-catalyzed "setting" of crude fish actomyosin. *The Journal of Biological Chemistry*, 241, 5518-5526.

Fort, N., Lanier, T.C., Amato, P.M., Carretero, C. & Saguer, E. (2008). Simultaneous

application of microbial transglutaminase and high hydrostatic pressure to improve heat induced gelation of pork plasma. *Meat Science*, 80, 939-943.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney, P.L. (2016). *Fundamentals of cheese science*. Ed Springer. Nueva York. ISBN 978-0-8342-1260-2.

Galán, E., Cabezas, L. & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25, 92-96.

Ganesan, B., Brown, K., Irish, D.A., Brothersen, C. & McMahon, D.J. (2014). Manufacture and sensory analysis of reduced- and low-sodium Cheddar and Mozzarella cheeses. *Journal of Dairy Science*, 97, 1970-1982.

García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I. & López, M.B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science and Technology*, 92, 691-707.

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

Gauche, C., Vieira, J.T.C., Ogliari, P.J. & Bordignon-Luiz, M.T. (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, 43, 788-794.

Gerrard, J.A., Newberry, M.P., Ross, M., Wilson, A.J., Fayle, S.E. & Kavale, S. (2000). Pastry Lift and Croissant Volume as Affected by Microbial Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 65, 312-314.

Gharibzahedi, S.M.T., Yousefi, S. & Chronakis, I.S. (2019). Microbial transglutaminase in noodle and pasta processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 313-327.

Gharibzahedi, S.M.T., Koubaa, M., Barba, F.J., Greiner, R., George, 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.

Góes-Favoni, S.P. de & Bueno, F.R. (2014). Microbial Transglutaminase: General Characteristics and Performance in Food Processing Technology. *Food Biotechnology*, 28, 1-24.

Goncu, A. & Alpkent, Z. (2005). Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or a commercial cheese culture as a starter. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 771-776.

González-Rábade, N., Badillo-Corona, J.A., Aranda-Barradas, J.S. & Oliver-Salvador, M. del C. (2011). Production of plant proteases in vivo and in vitro - A review. *Biotechnology Advances*, 29, 983-996.

Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C.M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *The Biochemical Journal*, 368, 377-396.

Grossmann, L., Wefers, D., Bunzel, M., Weiss, J. & Zeeb, B. (2017). Accessibility of transglutaminase to induce protein crosslinking in gelled food matrices-Influence of network structure. *LWT-Food Science and Technology*, 75, 271-278.

Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of



hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.

Guerra-Rodríguez, E. & Vázquez, M. (2014). Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 784-791.

Gusmão, T.A.S., Gusmão, R.P. de, Moura, H. V, Silva, H.A. & Cavalcanti-Mata, M E R M Duarte, M.E.M. (2019). Production of prebiotic gluten-free bread with red rice flour and different microbial transglutaminase concentrations : modeling, sensory and multivariate data analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 2949-2958.

Guyot, C. & Kulozik, U. (2011). Effect of transglutaminase-treated milk powders on the properties of skim milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 21, 628-635.

Hernando, I. & Lluch, M.A. (2000). Microstructural characterization of Burgos cheese different microscopy techniques. *Food Science and Technology International*, 6, 151-157.

Hinz, K., Huppertz, T. & Kelly, A.L. (2012). Susceptibility of the individual caseins in reconstituted skim milk to cross-linking by transglutaminase: influence of temperature, pH and mineral equilibria. *Journal of Dairy Research*, 79, 414-421.

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*, 65, 76-80.

Hong, G.P. & Xiong, Y.L. (2012). Microbial transglutaminase-induced structural and rheological changes of cationic and anionic myofibrillar proteins. *Meat Science*, 91, 36-42.

Icekson, I. & Apelbaum, A. (1987). Evidence for Transglutaminase Activity in Plant Tissue. *Plant Physiology*, 84, 972-974.

Ikura, K., Kometani, T., Yoshikawa, M., Sasaki, R., & Chiba, H. (1980). Crosslinking of casein components by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44, 1567-1573.

Ikura, K., Minami, K., Otomo, C., Hashimoto, H., Natsuka, S., Oda, K. & Nakanishi, K. (2014). High molecular weight transglutaminase inhibitor produced by a microorganism (*Streptomyces lavendulae* Y-200). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64, 116-124.

Iličić, M.D., Carić, M.D., Milanović, S.D., Dokić, L.P., Duric, M.S., Bošnjak, G.S. & Duraković, K.G. (2008). Viscosity changes of probiotic yoghurt with transglutaminase during storage. *Acta Periodica Technologica*, 39, 11-19.

Iličić, M.D., Milanović, S.D., Carić, M.D., Dokić, L.P. & Kanurić, K.G. (2014). Effect of Transglutaminase on Texture and Flow Properties of Stirred Probiotic Yoghurt during Storage. *Journal of Texture Studies*, 45, 13-19.

Iranzo, M., Aguado, C., Pallotti, C., Can, J. V, Mormeneo, S. & Valencia, B. (2002). Transglutaminase activity is involved in *Saccharomyces cerevisiae* wall construction. *Microbiology*, 148, 1329-1334.

Jacob, M., Jaros, D. & Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14-33.

Jaeger, S.R. & Cardello, A. V. (2009). Direct and indirect hedonic scaling methods: A comparison of the labeled affective magnitude (LAM) scale and best-worst scaling. *Food Quality and Preference*, 20, 249-258.

- Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T. & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113-155.
- Jian, S.T., Hsieh, J.F., Ho, M.L. & Chung, Y.C. (2000). Combination Effects of Microbial Transglutaminase, Reducing Agent, and Protease Inhibitor on the Quality of Hairtail Surimi. *Journal of Food Science*, 65, 241-245.
- Joseph, D., Lanier, T.C. & Hamann, D.D. (1994). Temperature and pH Affect Transglutaminase-Catalyzed "Setting" of Crude Fish Actomyosin. *Journal of food science*, 59, 1018-1023.
- Joshi, K.K., Haynes, A., Davis, E.A., Orsogna, L.D. & Mclean-tooke, A. (2019). Role of HLA-DQ typing and anti-tissue transglutaminase antibody titers in diagnosing celiac disease without duodenal biopsy in type 1 diabetes : A study of the population-based pediatric type 1 diabetes cohort of Western Australia. *Pediatric Diabetes*, 20, 567-573.
- Kaewudom, P., Benjakul, S. & Kijroongrojana, K. (2013). Properties of surimi gel as influenced by fish gelatin and microbial transglutaminase. *Food Bioscience*, 1, 39-47.
- Kanaji, T., Ozaki, H., Takao, T., Kawajiri, H., Ide, H., Motoki, M. & Shimonishi, Y. (1993). Primary Structure of Microbial Transglutaminase from. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 11565-11572.
- Kappeler, S.R., Brink, H.M. Van Den, Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E.B. & Johansen, E. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 647-654.
- Kashiwagi, T., Yokoyama, K. ichi, Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. & Suzuki, E. ichiro. (2002). Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44252-44260.
- Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S. & Hardy, J. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 239-251.
- Kieliszek, M. & Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia microbiologica*, 59, 241-250.
- Kogen, H., Kiho, T., Tago, K., Miyamoto, S., Fujioka, T., Otsuka, N., Suzuki-Konagai, K. & Ogita, T. (2000). Alutacenoic acids A and B, rare naturally occurring cyclopropanone derivatives isolated from fungi: Potent non-peptide factor XIIIa inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 1842-1843.
- Komáromi, I., Bagoly, Z. & Muszbek, L. (2011). Factor XIII: Novel structural and functional aspects. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 9-20.
- Kumazawa, Y., Nakagoshi, H., Sakaguchi, S., Seki, N., Gakkaishi, N.S. & Nio, N. (2004). Method for modifying raw material milk and dairy product prepared by using the modified raw material milk (Patente US 6716461B2).
- Kumazawa, Y., Nakanishi, K., Yasueda, H. & Motoki, M. (1996). Purification and Characterization of Transglutaminase from Walleye Pollack Liver. *Fisheries Science*, 62, 959-964.
- Kumazawa, Y., Sano, K., Seguro, K., Yasueda, H. & Nio, N. (1997). Purification and Characterization of Transglutaminase from Japanese Oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of*

Agricultural and Food chemistry, 45, 604-610.

Kuraishi, C., Yamazaki, K. & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17, 221-246.

Kurth, L. & Rogers, P.J. (1984). Transglutaminase Catalyzed Cross-Linking of Myosin to Soya Protein, Casein and Gluten. *Journal of Food Science*, 49, 573-576.

Kütemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H. & Watkinson, B.M. (2005). The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase. *Food Chemistry*, 16, 735-737.

Langston, J., Blinkovsky, A., Byun, T., Terribilini, M., Ransbarger, D. & Feng, X. (2007). Substrate Specificity of Streptomyces Transglutaminases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 136, 291-308.

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., Krause, I., Klostermeyer, H. & Henle, T. (2003). Microbial transglutaminase crosslinks  $\beta$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin to heterologous oligomers under high pressure. *European Food Research and Technology*, 216, 15-17.

Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H. & Henle, T. (2001a). Stability of microbial transglutaminase to high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213, 273-276.

Lauber, S., Noack, I., Klostermeyer, H. & Henle, T. (2001b). Oligomerization of  $\beta$ -lactoglobulin by microbial transglutaminase during high pressure treatment. *European Food Research and Technology*, 213, 246-247.

Lawless, H.T., Popper, R. & Kroll, B.J. (2010). A comparison of the labeled magnitude (LAM) scale, an 11-point category scale and the traditional 9-point hedonic scale. *Food Quality and Preference*, 21, 4-12.

Lee, E.Y. & Park, J. (2002). Pressure Inactivation Kinetics of Microbial Transglutaminase from *Streptovercillium mobaraense*. *Journal of Food Science*, 67, 1103-1107.

Lilla, S., Mogna, G. & Addeo, F. (2005). Validation of recombinant and bovine chymosin by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5230-5238.

Lim, J. (2011). Hedonic scaling: A review of methods and theory. *Food Quality and Preference*, 22, 733-737.

Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.

Loveday, S.M., Sarkar, A. & Singh, H. (2013). Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. *Trends in Food Science and Technology*, 33, 5-20.

Lucey, J.A. (2004). Cultured dairy products: An overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 77-84.

Lucey, J.A., Johnson, M.E. & Horne, D.S. (2003). Invited review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. *Journal of Dairy Science*, 86(9), 2725-2743.

- Macedo Alves, J., Sette Durães, L. & Harumi Sato, H. (2010). A Comparative Biochemical Characterization of Microbial Transglutaminases : Commercial vs. a Newly Isolated Enzyme from *Streptomyces Sp.* Food and Bioprocess Technology, 3, 308-314.
- Mádi, A., Punyiczki, M., Rao, M. Di, Piacentini, M. & Fésüs, L. (1998). Biochemical characterization and localization of transglutaminase in wild-type and cell-death mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. European journal of biochemistry, 253, 583-590.
- Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2009). Effect of microbial transglutaminase treatment on soft cheese properties. Mesopotamia Journal of Agriculture, 37, 19-27.
- Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2012). Improvement of Yogurt Properties by Microbial Transglutaminase. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 173, 333-342.
- MAPA. (2019). Informe de consumo alimentario en España, 2018. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/> (consultado el 01-11-2019).
- Mariniello, L., Prospero, D.P., Giosafatto, C.V.L., Sorrentino, A. & Porta, R. (2008). Transglutaminase in food biotechnology. Recent research developments in food biotechnology. Enzymes as additives or processing aids, 185-211.
- Martelo-Vidal, M.J., Fernández-No, I.C., Guerra-Rodríguez, E. & Vázquez, M. (2016). Obtaining reduced-salt restructured white tuna (*Thunnus alalunga*) mediated by microbial transglutaminase. LWT-Food Science and Technology, 65, 341-348.
- Martínez, M.A., Robledo, V., Velázquez, G., Ramírez, J.A., Vázquez, M. & Uresti, R.M. (2014). Food Hydrocolloids Effect of precooking temperature and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) proteins. Food hydrocolloids, 35, 264-269.
- Marx, C.K., Hertel, T.C. & Pietzsch, M. (2007). Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*. Enzyme and Microbial Technology, 40, 1543-1550.
- Matlung, H.L., Neele, A.E., Groen, H.C., Gaalen, K. Van, Guvenc, B., Weert, A. Van, Vos, J. De, Wentzel, J.J., Hoogenboezem, M., Buul, J.D. Van & Bakker, E.N.T.P. (2012). Transglutaminase activity regulates atherosclerotic plaque composition at locations exposed to oscillatory shear stress. Atherosclerosis, 224, 355-362.
- Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F. & Vallejo-Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. Food Chemistry, 141, 1902-1907.
- Menéndez, O., Rawel, H., Schwarzenbolz, U. & Henle, T. (2006). Structural Changes of Microbial Transglutaminase during Thermal and High-Pressure Treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1716-1721.
- Milanović, S.D., Carić, M.D., Iličić, M.D., Kanurić, K.G., Vukić, V.R., Hrnjez, D. V & Ranogajec, M.I. (2011). The optimisation of temperature for transglutaminase activation in probiotic yoghurt production. Prehrambena Industrija, 16, 16-20.
- Mohammad, S., Gharibzahedi, T. & Chronakis, I.S. (2018). Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase : Utilization in functional yogurt products foods. Food Chemistry, 245, 620-632.

- Mohanty, A.K., Mukhopadhyay, U.K., Grover, S. & Batish, V.K. (1999). Bovine chymosin: Production by rDNA technology and application in cheese manufacture. *Biotechnology Advances*, 17, 205-217.
- Mora-Gutierrez, A., Attaie, R., Kirven, J.M. & Farrell, H.M. (2014). Cross-linking of bovine and caprine caseins by microbial transglutaminase and their use as microencapsulating agents for n-3 fatty acids. *International Journal of Food Science and Technology*, 49, 1530-1543.
- Meilgaard, M.C., Carr, B.T., & Civille, G.V. (2016). *Sensory Evaluation Techniques*. 5<sup>th</sup> edition. Ed. CRC Press. Nueva York. ISBN 978-1-4822-1691-2.
- Moschopoulou, E. (2011). Characteristics of rennet and other enzymes from small ruminants used in cheese production. *Small Ruminant Research*, 101, 188-195.
- Motoki, M. & Kumazawa, Y. (2000). Recent Research Trends in Transglutaminase Technology for Food Processing. *Food Science and Technology Research*, 6, 151-160.
- Motoki, M. & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.
- Mycek, M.J., Clarke, D.D., Neidle, A. & Waelsch, H. (1959). Amine incorporation into insulin as catalyzed by transglutaminase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 84, 528-540.
- Neve, H., Lorenzen, P.C., Mautner, A., Schlimme, E. & Heller, K.J. (2001). Effects of transglutaminase treatment on the production of set skim milk yoghurt: Microbiological aspects. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 53, 349-359.
- Nishinari, K., Kohyama, K., Kumagai, H., Funami, T. & Bourne, M.C. (2013). Parameters of texture profile analysis. *Food Science and Technology Research*, 19, 519-521.
- Nonaka, M., Sakamoto, H., Toiguchi, S., Yamagiwa, K., Soeda, T. & Motoki, M. (1996). Retort-resistant tofu prepared by incubation with microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 10, 41-44.
- Novo Nordisk A/S. (2001). A method for identifying a transglutaminase-producing microorganism based on a Selective assay is disclosed (Patente US 6190879 B1).
- Nury, S. & Meunier, J. (1990). Molecular mechanisms of the irreversible thermal denaturation of guinea-pig liver transglutaminase. *Biochemical Journal*, 266, 487-490.
- O'Connell, J.E. & DeKruif, C.G. (2003).  $\beta$ -Casein micelles; cross-linking with transglutaminase. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 216, 75-81.
- O'Sullivan, M.M., Kelly, A.L. & Fox, P.F. (2002). Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of milk. *Journal of Dairy Research*, 69, 433-442.
- Oroian, M.A., Escriche, I. & Gutt, G. (2011). Rheological, textural, color and physico-chemical properties of some yogurt products from the Spanish market. *Food and Environment Safety-Journal of Faculty of Food Engineering, Ștefan cel Mare University - Suceava*, 10, 24-29.
- Özer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A. & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- Özer, 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.

Özer, B., Hayaloglu, A.A., Yaman, H., Gürsoy, A. & Şener, L. (2013). Simultaneous use of transglutaminase and rennet in white-brined cheese production. *International Dairy Journal*, 33, 129-134.

Oznen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.

Pagani, C. (2015). Uso de TG (transglutaminasa) en yogures y quesos. En: Sexto congreso Internacional de Lechería de AUTEL. Montevideo, Uruguay. 14-15 de Julio, Colonia de Sacramento. Disponible en: <https://docplayer.es/22917566-Uso-de-tg-transglutaminasa-en-yogures-y-quesos.html>.

Pakseresht, S., Mazaheri Tehrani, M. & Razavi, S.M.A. (2017). Optimization of low-fat set-type yoghurt: effect of altered whey protein to casein ratio, fat content and microbial transglutaminase on rheological and sensorial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2351-2360.

Pasternack, R., Dorsch, S., Otterbach, J.T., Robenek, I.R., Wolf, S. & Fuchsbaue, H.-L. (1998). Bacterial pro-transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*. *European Journal of Biochemistry*, 257, 570-576.

Pereira, R., Matia-Merino, L., Jones, V. & Singh, H. (2006). Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: A sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, 20, 305-313.

Pereira, R.B., Singh, H., Munro, P.A. & Luckman, M.S. (2003). Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. *International Dairy Journal*, 13, 655-667.

Pierro, P. Di, Mariniello, L., Sorrentino, A., Valeria, C.L., Chianese, L., Porta, R., Di, P., Mariniello, L. & Sorrentino, A. (2010). Transglutaminase-Induced Chemical and Rheological Properties of Cheese Chemical and Rheological. *Food Biotechnology*, 24, 107-120.

Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L.H. & Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42, 324-330.

Puszkin, E.G. & Raghuraman, V. (1986). Catalytic Properties of a Calmodulin-regulated Transglutaminase from Human Platelet and Chicken Gizzard. *Journal of Biological Chemistry*, 260, 16012-16020.

Queirós, R.P., Gouveia, S., Saraiva, J.A. & Lopes-da-silva, J.A. (2019). Impact of pH on the high-pressure inactivation of microbial transglutaminase. *Food Research International*, 115, 73-82.

Ramírez-López, C. & Vélez-Ruiz, J.F. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 131-148.

Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado*, 28 de abril de 2014, núm. 102, pag. 33154-33157.

Reed, D.R., Tanaka, T. y McDaniel, A.H. (2006). Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiology & Behavior*, 88, 215-226.

Renzetti, S., Dal Bello, F. & Arendt, E.K. (2008). Microstructure, fundamental rheology and

- baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase. *Journal of Cereal Science*, 48, 33-45.
- Rodríguez-Nogales, J.M. (2006). Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cows' milk: A statistical approach. *International Dairy Journal*, 16, 26-32.
- Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V. & Pungercar, J. (2001). Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production. *Journal of Dairy Science*, 84, 1020-1026.
- Romeih, E. A. & Walker, G. (2017). Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 133-140.
- Romeih, E. A., & Hamad, E. M. (2010). Influence of microbial transglutaminase on some physical and microstructural properties of cow milk coagulum supplemented with whey proteins. *Journal of Food & Dairy Science, Mansoura University*, 1, 595-607.
- Romeih, E.A., Abdel-Hamid, M. & Awad, A.A. (2014). The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt. *Dairy Science and Technology*, 94, 297-309.
- Rossa, P.N., Burin, V.M. & Bordignon-Luiz, M.T. (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.
- Rossa, P.N., Sá, E.M.F. de, Burin, V.M. & Bordignon-Luiz, M.T. (2011). Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 29-34.
- Rossi Marquez, G., Pierro, P. Di, Mariniello, L., Esposito, M., Giosafatto, C.V.L. & 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.
- Rostamzad, H., Yousef, S. & Shabanpour, B. (2016). Improvement of fish protein film with nanoclay and transglutaminase for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 1-7.
- Routray, W. & Mishra, H.N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 208-220.
- Salvador, A. & Fiszman, S.M. (2004). Textural and Sensory Characteristics of Whole and Skimmed Flavored Set-Type Yogurt During Long Storage. *Journal of Dairy Science*, 87, 4033-4041.
- Sane, D.C., Kontos, J.L. & Greenberg, C.S. (2009). Roles of transglutaminases in cardiac and vascular diseases. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 12, 2530-2545.
- 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.
- Sarkar, N.K., Clarke, D.D. & Waelsch, H. (1957). An enzymically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 451-452.
- Schorsch, C., Carrie, H. & Norton, I.T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: Influence of cross-links in acid-induced gelation. *International Dairy Journal*, 10, 529-539.

- Seguro, K., Nio, N. & Motoki, M. (1996). Some Characteristics of a Microbial Protein Cross-Linking Enzyme : Transglutaminase. *Macromolecular Interactions in Food Technology*, 21 271-280.
- Seki, N. (1990). Transglutaminase activity in Alaska pollack muscle and surimi and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56, 125-132.
- Selin, A., Demet, E., Çağım, A.Ç., Hasan, V., Asliye, K. & Mehmet, K. (2018). Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food Science & Nutrition*, 6, 1100-1108.
- Seo, S., Moon, Y., Choi, J., Yoon, S., Jung, K.H. & Cheon, J. (2019). The GTP binding activity of transglutaminase 2 promotes bone metastasis of breast cancer cells by downregulating microRNA-205. *American Journal of Cancer Research*, 9, 597-607.
- Seravalli, E.A.G., Iguti, A.M., Santana, I.A. & Finardi Filho, F. (2011). Effects of application of transglutaminase in wheat proteins during the production of Bread. *Procedia Food Science*, 1, 935-942.
- Shah, M.A. & Mir, S.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking : a review. *Dairy Science & Technology*, 94(1), 5-16.
- Sharma, R., Lorenzen, P.C. & Qvist, K.B. (2001). Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. *International Dairy Journal*, 11, 785-793.
- Sharma, R., Zakora, M. & Qvist, K.B. (2002). Susceptibility of an industrial  $\alpha$ -lactalbumin concentrate to cross-linking by microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, 12, 1005-1012.
- Shimba, N., Shinohara, M., Yokoyama, K. I., Kashiwagi, T., Ishikawa, K., Ejima, D., & Suzuki, E. I. (2002). Enhancement of transglutaminase activity by NMR identification of its flexible residues affecting the active site. *FEBS letters*, 517, 175-179.
- Shin, M., Gang, D.O. & Song, J.Y. (2010). Effects of Protein and Transglutaminase on the Preparation of. *Food Science and Biotechnology*, 19, 951-956.
- Smith, D. V., & Margolskee, R. F. (2001). El sentido del gusto. *Investigación y Ciencia*, 296, 4-13.
- Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N. & Bawa, A.S. (2008). Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7, 15-28.
- Sommer, C., Volk, N. & Pietzsch, M. (2011). Model based optimization of the fed-batch production of a highly active transglutaminase variant in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 77, 9-19.
- Sorapukdee, S. & Tangwatcharin, P. (2018). Quality of steak restructured from beef trimmings containing microbial transglutaminase and impacted by freezing and grading by fat level. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 31, 129-137.
- Sousa, M. & Malcata, F.X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, 82, 151-170.
- Statista (2019). Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/492370/consumo-de-los-hogares-espanoles-de-yogur/> (consultado el 03-11-2019)



Stone, H. & Sidel, J.L. (1993). Sensory evaluation practices. 2<sup>nd</sup> edition. Ed. Academic Press. San Diego. ISBN 0-12-672482-2.

Sugino, H., Terakawa, Y., Yamasaki, A., Nakamura, K. & Higuchi, Y. (2002). Molecular characterization of a novel nuclear transglutaminase that is expressed during starfish embryogenesis. *European journal of biochemistry*, 269, 1957-1967.

Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., Kubota, K. & Yokozeki, K. (2014). Purification and Characterization of Novel Transglutaminase from *Bacillus subtilis* Spores. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(11), 2344-2351.

Tamine, A.Y. & Robinson, R.K. (1999). *Yoghurt : science and technology*. 2<sup>nd</sup> edition. Florida: Ratón, Boca.

Tamjidi, F., Nasirpour, A. & Shahedi, M. (2012). Physicochemical and sensory properties of yogurt enriched with microencapsulated fish oil. *Food science and technology international*, 18, 381-390.

Tang, C.-H., Yang, X.-Q., Chen, Z., Wu, H. & Peng, Z. (2005). Physicochemical and structural characteristics of sodium caseinate biopolymers induce by microbial transglutaminase. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 402-421.

Téllez-Luis, S.J., González-Cabriales, J.J., Ramírez, J.A. & 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.

Tesfaw, A. & Assefa, F. (2014). Applications of Transglutaminase in Textile Wool, and Leather Processing. *International Journal of Textile Science*, 3, 64-69.

Timón, M.L., Parra, V., Otte, J., Broncano, J.M. & Petró, M.J. (2014). Identification of radical scavenging peptides (<3 kDa) from Burgos-type cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 57, 359-365.

Trespacios, P. & Pla, R. (2007). Food Chemistry Synergistic action of transglutaminase and high pressure on chicken meat and egg gels in absence of phosphates. *Food Chemistry*, 104, 1718-1727.

Truong, V.-D., Clare, D. a, Catignani, G.L. & Swaisgood, H.E. (2004). Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1170-1176.

Tsevdou, M.S., Eleftheriou, E.G. & Taoukis, P.S. (2013). Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk: Effects on the properties and storage stability of set yoghurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 144-152.

Tymiak, A., Tuttle, J.G., Kimball, S.D., Wang, T. & Lee, V.G. (1993). Through Screening of Pharmaceutical Can Be Based on the Extent of Clot Dissolution By. *The Journal of Antibiotics*, 46, 204-206.

Umezawa, Y., Ohtsuka, T., Yokohama, K. & Nio, N. (2002). Comparison of Enzymatic Properties of Microbial Transglutaminase from *Streptomyces* sp., *Food Science and Technology Research*, 8, 113-118.

UNE-EN ISO 11132:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía para la supervisión del desempeño de un panel sensorial cuantitativo. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.

- UNE-EN ISO 11136:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía general para la realización de pruebas hedónicas con consumidores en una zona controlada. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 13299:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía general para establecer un perfil sensorial. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 5492:2010/Amd1:2016. (2010). Análisis sensorial. Vocabulario. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-ISO 6658:2019 (2019). Análisis sensorial. Metodología. Guía general. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de catadores y catadores expertos. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 8589:2010. (2010). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-ISO 4121:2006. (2006). Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE 87027:2018. (2018). Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para la elaboración de un perfil sensorial mediante diferentes enfoques. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).
- Volken de Souza, C.F., Guimarães Venzke, J., Hickmann Flôres, S. & Záchia Ayub, M.A. (2011). Enzymatic properties of transglutaminase produced by a new strain of *Bacillus circulans* BL32 and its action over food proteins. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 443-450.
- Wang, L., Yu, B., Wang, R. & Xie, J. (2018). Trends in Food Science & Technology Biotechnological routes for transglutaminase production: Recent achievements, perspectives and limits. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 116-120.
- Worratao, A. & Yongsawatdigul, J. (2005). Food Chemistry Purification and characterization of transglutaminase from Tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food chemistry*, 93, 651-658.
- Wróblewska, B., Kaliszewska, A., Kołakowski, P., Pawlikowska, K. & Troszyńska, A. (2011). Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 215-227.
- Yang, X. & Zhang, Y. (2019). Expression of recombinant transglutaminase gene in *Pichia pastoris* and its uses in restructured meat products. *Food Chemistry*, 291, 245-252.
- Yasueda, H., Yoshiyuki, K. & Motoki, M. (2014). Purification and Characterization of a Tissue-type Transglutaminase from Red Sea Bream (*Pagrus major*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58, 2041-2045.

- Yegin, S. & Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science and Technology*, 93, 565-594.
- Yerlikaya, P., Aydan, H., Gokoglu, N. & Ucak, I. (2017). The quality alterations of rainbow trout mince treated with transglutaminase. *LWT-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.
- Yüksel, Z., Avci, E. & Erdem, Y.K. (2011). Modification of the renneting process in Berridge substrate by transglutaminase, *International Journal of Dairy Technology*, 64, 365-371.
- Yüksel, Z. & Erdem, Y.K. (2010). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 86-97.
- Yung, C.W., Wu, L.Q., Tullman, J.A., Payne, G.F., Bentley, W.E. & Barbari, T.A. (2007). Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 83, 1039-1046.
- Zamora, A., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. & Trujillo, A. (2012). Ultra-high pressure homogenisation of milk : technological aspects of cheese-making and microbial shelf life of a starter-free fresh cheese. *Journal of Dairy Research*, 79, 168-175
- Zhong, Q., Wang, W., Hu, Z. & Ikeda, S. (2013). Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of whey protein isolate at pH 7.0 during thermal sterilization. *Food Hydrocolloids*, 31, 306-316.
- Zhu, Y. & Tramper, J. (2008). Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology*, 26, 559-565.
- Zotzel, J., Keller, P. & Fuchsbaue, H. (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. (2003b). Activated transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* is processed by a tripeptidyl aminopeptidase in the final step. *European Journal of Biochemistry*, 270, 4149-4155.



## 2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es estudiar el efecto del uso de transglutaminasa microbiana (mTG) en productos lácteos, concretamente en yogur firme y queso fresco.

Para alcanzar el objetivo general se establecen los siguientes **objetivos específicos**:

1. Evaluar el efecto de la aplicación de la mTG en yogures firmes desnatados para determinar si los valores de los parámetros físico-químicos determinados son similares a los obtenidos para un yogur entero.
2. Establecer el perfil sensorial de yogures firmes desnatados y evaluar el efecto de la adición de mTG sobre las características sensoriales del producto final, así como su relación con las características físico-químicas.
3. Estudiar las características sensoriales y la aceptación y preferencia de yogures firmes desnatados elaborados con una mTG producida en el propio laboratorio y una mTG comercial, frente a yogures firmes desnatados control, y evaluar si la utilización de mTG puede evitar la fortificación del yogur desnatado con leche desnatada en polvo, procedimiento habitual utilizado en la elaboración industrial de yogur.
4. Evaluar los efectos del tiempo de almacenamiento en las propiedades sensoriales y físico-químicas de un yogur firme desnatado elaborado con la mTG producida en el propio laboratorio y una mTG comercial comparados con un yogur control sin mTG elaborado tal y como es habitual en la elaboración industrial de yogur.
5. Determinar el efecto del tipo de cuajo y de la mTG sobre las propiedades físico-químicas y el rendimiento obtenido en un queso fresco elaborado con leche de vaca entera pasteurizada.
6. Determinar el efecto del tipo de cuajo y de la mTG sobre las propiedades sensoriales del queso fresco elaborado con leche de vaca entera pasteurizada.
7. Estudiar la aceptación y la preferencia del consumidor y evaluar los efectos del tiempo de almacenamiento sobre las propiedades sensoriales y físico-químicas de un queso fresco elaborado con mTG y diferentes cuajos.



### **3. PLAN DE TRABAJO**

Para alcanzar los objetivos planteados, se diseña el plan de trabajo que se describe a continuación.

#### **3.1. APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (MTG) EN YOGUR FIRME**

En primer lugar, y a fin de establecer el método de elaboración más adecuado, se preparan en el laboratorio yogures firmes utilizando leche desnatada UHT y se ensayan diferentes métodos de aplicación de la mTG, diferentes niveles de dosificación y diferentes tipos de mTGs. Para evaluar los distintos factores ensayados se utilizan como control yogures elaborados con la misma leche desnatada UHT, sin mTG, y yogures enteros y desnatados comerciales.

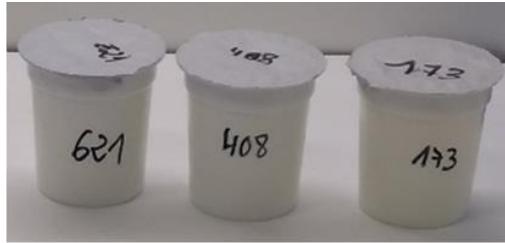
Las muestras son analizadas desde un punto de vista físico-químico, de textura instrumental y sensorial (con un panel de catadores entrenado y validado) para, en función de los resultados obtenidos, seleccionar el mejor método de aplicación, la dosis óptima y el tipo de mTG.

Con las condiciones de operación seleccionadas, se elaboran en una planta piloto, yogures firmes utilizando leche desnatada pasteurizada y mTG que son evaluados a nivel sensorial por un panel de consumidores para determinar el grado de aceptación y preferencia en comparación con un yogur firme control sin mTG, elaborado por los procedimientos habituales para los yogures comerciales.

Dado que por motivos de confidencialidad de los resultados obtenidos no se ha podido publicar la comparativa entre los yogures elaborados con mTG comercial y la obtenida en nuestro laboratorio se hace la comparación de forma independiente de cada una de ellas con el yogur control, sin mTG.

Finalmente, se determina la vida útil de los yogures elaborados en planta piloto, tanto desde un punto de vista instrumental como sensorial utilizando el panel de catadores entrenado.

En la figura 3.1. se resume el plan de trabajo seguido para analizar el efecto de la mTG en el yogur firme.



Elaboración de yogur firme desnatado con mTG (diferentes métodos de elaboración, dosis y tipo) y yogur control sin mTG



Determinación de las características físico-químicas y sensoriales de los yogures previamente elaborados y de yogures comerciales



Selección de las condiciones óptimas de aplicación de la mTG en yogures (método de adición, dosis y tipo)

Establecimiento de la vida útil



Figura 3.1. Plan de trabajo para la evaluación del efecto de la aplicación de mTG en el yogur firme desnatado.



### **3.2. APLICACIÓN DE TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA (mTG) EN QUESO FRESCO**

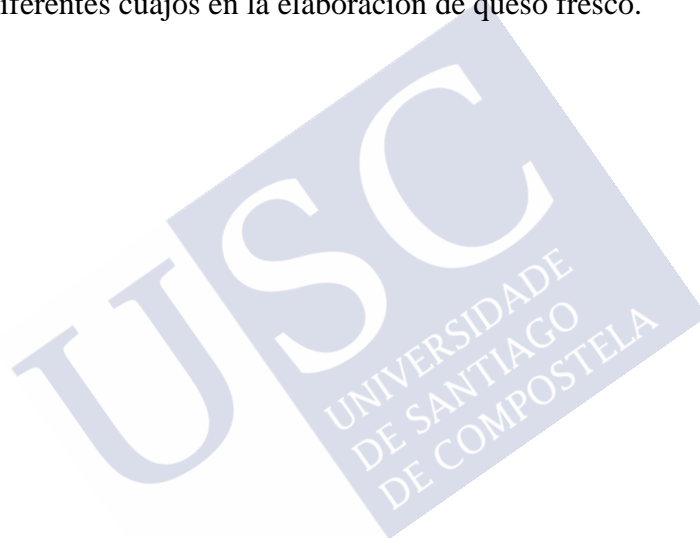
Se elaboran en el laboratorio quesos frescos a partir de leche entera pasteurizada y mTG, combinada con diferentes cuajos comerciales.

Una vez obtenidos los quesos se analizan las características físico-químicas, de textura instrumental y las características sensoriales (con un panel de catadores entrenado) y se calcula el rendimiento. Para ello, los quesos obtenidos se comparan con los correspondientes quesos frescos control sin mTG.

En función de los resultados obtenidos se seleccionan 2 cuajos. Con los cuajos seleccionadas, se elaboran quesos para ser evaluados por un panel de consumidores para determinar el grado de aceptación y preferencia en comparación con los quesos control sin mTG.

Se determina, además, la vida útil de los quesos, tanto desde un punto de vista físico-químico como sensorial.

En la figura 3.2. se resume el plan de trabajo seguido para estudiar el efecto de la mTG combinada con diferentes cuajos en la elaboración de queso fresco.





Elaboración de queso fresco con diferentes cuajos y con y sin mTG



Determinación de las características físico-químicas y sensoriales de los quesos previamente elaborados



Selección del cuajo más adecuado para combinar con la mTG

Establecimiento de la vida útil

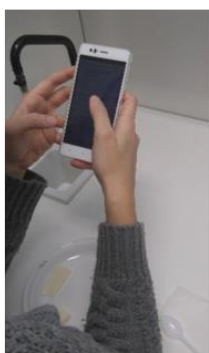


Figura 3.2. Plan de trabajo para evaluar el efecto de la mTG combinada con diferentes cuajos para la elaboración de queso fresco.



## 4. EVALUACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE YOGURES DESNATADOS PRODUCIDOS CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA

### Resumen

Actualmente, los consumidores demandan yogures bajos en grasa o desnatados, pero sus propiedades físicas son menos atractivas que las de los yogures enteros. Hay evidencias de que la transglutaminasa microbiana (mTG) se puede utilizar para mejorar las características y defectos que aparecen con frecuencia en los yogures desnatados.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la adición de mTG en la elaboración de yogur desnatado y comprobar si sus características físico-químicas son comparables a las de un yogur entero comercial.

Se evalúan, para la selección de las condiciones más favorables para su elaboración, 2 métodos de aplicación de la mTG (adición antes de la fermentación o adición simultánea con el cultivo iniciador), 3 niveles de dosis (0.5, 1 y 2 U·mTG g<sup>-1</sup> de proteína) y 2 mTG de diferentes orígenes (una comercial y otra de elaboración propia). Los resultados se comparan con los obtenidos para yogures desnatados comerciales y para yogures enteros comerciales.

No se observan diferencias significativas entre los 2 métodos de aplicación de la mTG (antes de la adición del cultivo iniciador y de forma simultánea a la adición de éste).

Se opta por la adición simultánea de la mTG porque no requiere etapas adicionales lo que supone ahorro de tiempo. La dosis seleccionada es de 1 U·mTG g<sup>-1</sup> de proteína, que da lugar a una firmeza y consistencia más alta que la observada en los yogures enteros comerciales y unos valores de cohesividad y viscosidad similares a los yogures enteros comerciales usando la mTG propia (TG2).

Se observan algunas diferencias en función del origen de la mTG que pueden deberse a los excipientes.

La mTG puede usarse para reemplazar los estabilizantes y texturizantes en la producción de yogures desnatados, ya que mejora la textura y evita la sinéresis.

**Palabras Clave:** transglutaminasa; yogur; evaluación físico-química; textura; reticulación; geles ácidos

---

Este capítulo está publicado en: *García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98, 5479-5485 (Anexo 1).*

## 4.1 INTRODUCCIÓN

La obtención de muchos productos lácteos como el yogur y el queso se basa en la gelificación de las proteínas. La acidificación y la acción de las proteasas provocan la gelificación de las proteínas de la leche. La estructura del gel está formada por enlaces no covalentes débiles. Se pueden obtener geles estables mediante reacciones químicas. Sin embargo, no es factible debido a la toxicidad potencial o reacciones secundarias no deseadas. Por lo tanto, la modificación enzimática es la opción más adecuada (Faergemand *et al.*, 1998).

Las transglutaminasas (TGs) (R-glutaminil-peptido  $\gamma$ -glutaminil-transferasa) catalizan reacciones de reticulación entre los grupos  $\gamma$ -carboxamida de los residuos de glutamina y los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina. Las TGs son una familia de enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza (Griffin *et al.*, 2002).

La transglutaminasa microbiana (mTG) es activa en un amplio rango de temperaturas y estable en el rango de pH 5-9 y muestra una actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente que la hace adecuada para su aplicación en productos lácteos (Ando *et al.*, 1989). El relativo bajo coste de su producción hace que la mTG sea adecuada para su aplicación en el procesado de alimentos, por su capacidad para mejorar diversas características determinantes en las propiedades de los alimentos de base proteica (Motoki and Seguro, 1998; Mariniello *et al.*, 2008; Aguilar-Zárate *et al.*, 2012) como es el caso de los productos lácteos (Gerrard, 2002; Şanlı *et al.*, 2011, 2014; Rossa *et al.*, 2012; Şanlı, 2015).

Hoy en día, la tendencia en los productos lácteos, y concretamente en yogures, es hacia una producción de yogures bajos en grasa o desnatados (Romeih *et al.*, 2014). Sin embargo, ni las características de textura, ni la sinéresis de éstos productos son comparables con las de los yogures enteros (Carić *et al.*, 2011). Autores como Iličić *et al.* (2013) indican que se pueden obtener yogures con un bajo contenido calórico, con propiedades físicas y químicas aceptables usando mTG. La polimerización de las proteínas de la leche por acción de la mTG es una forma efectiva de mejorar las propiedades físicas de los productos lácteos (Gauche *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2014). Por lo tanto, la mTG puede reemplazar los sólidos lácteos y/o los estabilizantes que frecuentemente son incorporados en la producción de yogures desnatados o bajos en grasa (Chang *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017a,b).

En la actualidad, en Europa, las enzimas son consideradas como coadyuvantes del proceso productivo, de acuerdo con la Directiva 89/107/CEE. Esto significa que, al actuar como coadyuvante, la mTG no se puede detectar en el producto final ya que pierde actividad de forma espontánea a pH 5 siendo completamente inactiva a pH 4.3. Por lo tanto, la declaración de la mTG en la lista de ingredientes es innecesaria. La FDA declara la mTG como sustancia segura (GRAS).

Hay 2 métodos para la incorporación de la mTG en la producción de yogur: a) añadir la mTG simultáneamente con el cultivo iniciador y b) añadir la mTG antes del cultivo iniciador (Bönisch *et al.*, 2007). En el primer método la mTG se inactiva gradualmente por acidificación del medio (Şanlı *et al.*, 2011). El segundo método requiere 2 etapas adicionales, una para la incubación previa con la mTG y otra para la inactivación térmica de la enzima. La ventaja de este segundo método es que la acción de la mTG tiene lugar a pH constante (Wróblewska *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de la mTG en yogures bajos en grasa y determinar si parámetros como pH, Aw, sinéresis y determinadas características de la textura medidas de forma instrumental son similares a los obtenidos para un yogur entero. Para ello, se evalúan 2 métodos de aplicación de la mTG (previo y simultáneo a la fermentación), así como 3 niveles de dosificación y 2 orígenes de la mTG.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Materias primas

Se usa leche desnatada comercial (UHT), con un contenido en grasa del 0.2% y un contenido total proteico del 3.1%, para la elaboración del yogur.

La mTG comercial Activa YG (TG1) la suministra Ajinomoto Co. Inc. (Tokio, Japón). La actividad declarada es de 100 U g<sup>-1</sup>. Debido a que la actividad de la mTG disminuye con el tiempo, la actividad real de la mTG se mide el mismo día de su aplicación y el resultado obtenido es de 77 U·g<sup>-1</sup>.

La otra mTG (TG2) utilizada en el estudio, se produce en nuestro laboratorio, siguiendo el proceso descrito en la patente española ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012b). Al igual que para la mTG comercial, se mide la actividad de TG2 el mismo día de la aplicación, obteniéndose un valor de 440 U·g<sup>-1</sup>.

Tanto para medir la actividad de la mTG antes de su aplicación, como para determinar la actividad residual de la misma en el producto final, se usa un procedimiento colorimétrico utilizando espectrofometría NanoDrop®, usando N- $\alpha$ -CBZ-gln-gly (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato. La curva de calibración se elabora usando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). Una unidad de transglutaminasa se define como la formación de un 1  $\mu$ mol de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato en 1 min a 37°C (Grossowicz *et al.*, 1950).

### 4.2.2 Elaboración de los yogures

El yogur control sin mTG (Control) se elabora usando leche desnatada UHT calentada a 42°C. A esta leche se le inoculan 0.2 g L<sup>-1</sup> de un cultivo láctico liofilizado de *Streptococcus Thermophilus* y *Lactobacillus Bulgaricus* (LyoCulture Dairy, BDF Natural Ingredients, Girona, Spain) y se agita a 600 rpm durante 5 min. Los envases (125 g) se llenan con la leche inoculada y se fermentan a 42°C durante 8 h. Después de la fermentación, las muestras se enfrían y se almacenan a 4°C.

Para la aplicación de la mTG, se evalúan 2 procedimientos, utilizando la misma leche que la utilizada para el yogur Control: el método de 2 etapas (P), con adición de la mTG antes de la adición del cultivo iniciador y el método de 1 etapa (S), con adición simultánea de la mTG y el cultivo iniciador (Figura 4.1).

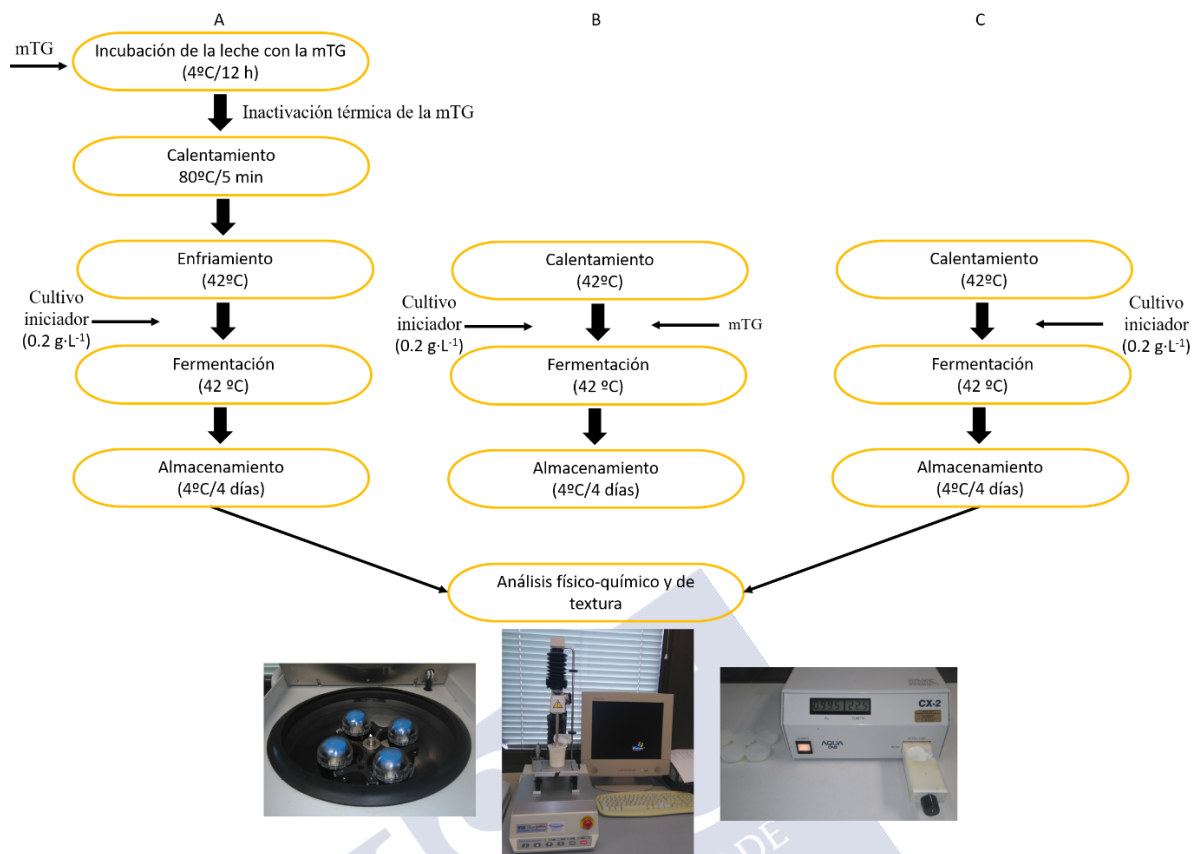


Figura 4.1. Diagrama de flujo para la elaboración de los yogures obtenidos con mTG por el método de 2 etapas (A), por el método de 1 etapa (B) y para el yogur Control (C).

Para el método de 2 etapas (P), se incuba la leche con mTG antes de la fermentación. La mTG se añade a la leche UHT y se incuba a 4°C durante 12 h. A continuación, se calienta a 80°C durante 5 min, con la finalidad de inactivar la enzima y se enfría hasta la temperatura de fermentación (42°C), continuando el proceso descrito para la muestra Control.

Para el método de 1 etapa (S), la incubación con la mTG y la fermentación son llevadas a cabo de manera simultánea. La enzima se inactiva gradualmente al disminuir el pH. El proceso continúa como el descrito para el yogur Control. Al finalizar la fermentación, no se detecta actividad de la mTG en ninguna muestra.

Para completar el estudio se evalúan yogures enteros y desnatados de varias marcas comerciales.

#### 4.2.3 Evaluación físico-química de los yogures

Todas las determinaciones físico-químicas se realizan 4 días después de la elaboración de los yogures.

Se usa un texturómetro TA.XTplus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Vienna Court, UK) con una plataforma de extrusión inversa (modelo A/BE, 40 mm de diámetro interno) para medir la fuerza requerida para la extrusión del yogur alrededor del disco de un pistón de 35 mm, usando la técnica descrita previamente por Velázquez *et al.* (2008). Se miden 5 muestras de cada uno de los tratamientos. Cada una de las muestras se introduce en la celda evitando las burbujas de aire y se extrusionan a 60 mm·min<sup>-1</sup> hasta el 80% de su altura inicial. Se usa una celda de carga de 5 kg. La sonda de disco penetra el 80% y vuelve a su posición original.

El pico o la fuerza máxima se toma como la medida de la firmeza y el área de la curva hasta este punto se toma como la medida de la consistencia. El pico negativo de fuerza mínima, debido a la extrusión inversa, se toma como la medida de la cohesividad. El área de la región negativa de la curva, obtenida de la extrusión inversa proporciona el índice de viscosidad.

La sinéresis inicial (sinéresis.i), se determina como el peso del líquido liberado en la superficie del yogur en el día 4. La sinéresis residual (sinéresis.r), se determina como el líquido liberado por 30 g de yogur después de centrifugar a 222 g durante 10 min a 10°C (Tamjidi *et al.*, 2012) en el día 4.

La actividad de agua ( $A_w$ ) se determina para cada tratamiento, utilizando un medidor AquaLab (Pullman, EE. UU.). Las muestras correspondientes a cada tratamiento se analizan por triplicado.

El pH se determina utilizando un medidor de pH portátil (PCE-PH22, PCE Holding GmbH, Meschede, Alemania). Las muestras correspondientes a cada tratamiento se analizan por triplicado.

#### 4.2.4 Análisis estadístico

Todos los cálculos estadísticos se realizan utilizando el software IBM SPSS Statistics 20 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) y el software R (Core Team, 2018). Las diferencias a un nivel de  $p < 0.05$  se consideran significativas.

Las características físico-químicas (pH,  $A_w$ , sinéresis.r, sinéresis.i, consistencia, cohesividad, firmeza e índice de viscosidad) se evalúan mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de 1 factor (método de adición de mTG, dosis de mTG o tipo de mTG). El test *post hoc* HSD de Tukey se aplica para mostrar las diferencias entre las muestras 2 a 2.

Cuando las variables no cumplen con el supuesto de normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefords), se aplican el test de Kruskal-Wallis (Kruskal and Wallis, 1952) y el test de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni (Wilcoxon, 1945; Nakagawa, 2004).

Cuando las variables no cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza (test de Levene) requerido para aplicar el test ANOVA, se aplican los test de Welch y Games-Howell (Ruxton and Beauchamp, 2008).

Además, se aplica un Análisis de Componente Principales (PCA) para identificar variables subyacentes o factores que expliquen el patrón de correlaciones dentro del conjunto de variables observadas.

### 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1 Evaluación del método de adición de la mTG

Se analizan las características de los yogures comerciales (desnatado y entero), del yogur Control (sin adición de mTG) y de los yogures obtenidos mediante los 2 procedimientos de adición de mTG ( $0.5 \text{ U mTG} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína, es decir, la adición simultánea de la mTG comercial (TG1) con el cultivo iniciador (método en 1 etapa, S) y adición de la mTG antes de la adición del starter (método en 2 etapas, P). En el método P, la mTG actúa a 4°C durante 12 h para evitar el crecimiento de microorganismos alterantes y el efecto de las proteasas.

Los resultados de la evaluación mecánica de la textura se muestran en la figura 4.2. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la firmeza ( $p=0.0000$ ). La firmeza más baja (92 g) se obtiene para el yogur Control y la más elevada para el yogur entero comercial (343 g). Se obtiene una firmeza similar entre el yogur elaborado con la adición simultánea de la mTG y el cultivo iniciador (TG1S0.5) y el yogur desnatado comercial (Figura 4.2a).



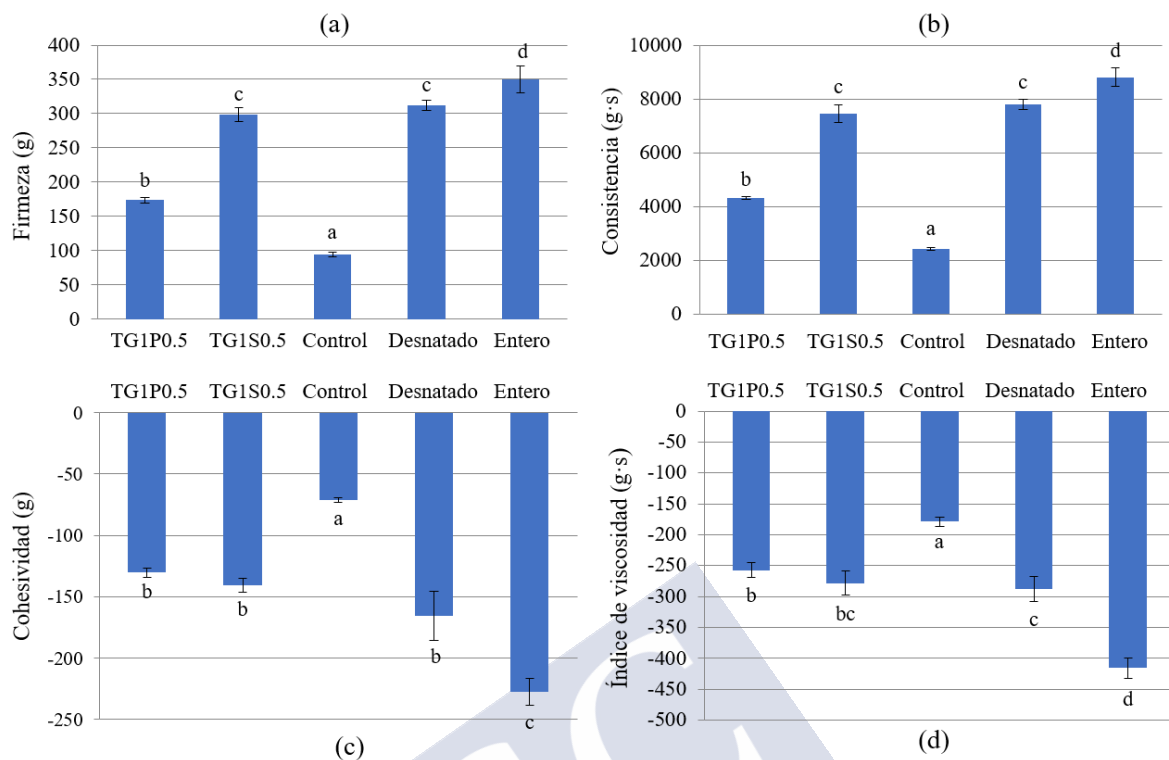
También se observan diferencias estadísticamente significativas en la consistencia ( $p=0.0000$ ). La mayor consistencia la presentan los yogures enteros comerciales (8643 g·s) y la más baja los yogures Control (2373 g·s). La utilización de mTG permite obtener yogures con consistencias significativamente diferentes entre sí. Así, la adición simultánea de mTG y el cultivo iniciador (TG1S0.5) proporciona yogures con una consistencia similar a la del yogur desnatado comercial, mientras que la adición de la mTG previa a la fermentación (TG1P0.5) da lugar a yogures con una menor consistencia (Figura 4.2b).

Igualmente, se observan diferencias estadísticamente significativas en la cohesividad ( $p=0.0000$ ). La cohesividad más baja es la obtenida para los yogures Control. La cohesividad de los yogures obtenidos por ambos métodos de adición de la mTG (TG1P0.5 y TG1S0.5) y la de los yogures desnatados comerciales presenta valores similares. El valor de cohesividad más elevado se observa para los yogures enteros comerciales (Figura 4.2c).

También se observan diferencias estadísticas significativas para el índice de viscosidad ( $p=0.0000$ ). El menor índice de viscosidad lo presentan los yogures Control. El índice de viscosidad de los yogures con mTG, obtenidos por ambos métodos (TG1P0.5 o TG1S0.5), y el de los yogures desnatados comerciales es similar. La viscosidad más alta, se observa en los yogures enteros comerciales (Figura 4.2d).

En general, los yogures Control muestran menor firmeza, menor consistencia, menor cohesividad y menor viscosidad que los yogures con mTG y que los yogures comerciales. Estudios previos, ponen de manifiesto que la adición de mTG incrementa la firmeza (Partanen *et al.*, 2008).

En el presente estudio, se obtienen resultados similares para los yogures obtenidos mediante los 2 métodos de adición de mTG. Por lo tanto, se considera que no es necesario utilizar el método en 2 etapas para la producción de yogur utilizando la mTG ya que se obtienen buenos resultados con el método de adición simultánea (1 etapa).



**Figura 4.2. Parámetros de textura mecánica de los yogures obtenidos por el método de 2 etapas (TG1P0.5), por el método 1 etapa (TG1S0.5), del desnatado comercial, del entero comercial y del yogur sin TG (Control). Letras diferentes para el mismo parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).**

Los resultados del resto de los parámetros determinados se muestran en la tabla 4.1. Los yogures con mTG no liberan suero (sinéresis.i) que, sin embargo, si se observa en el yogur Control y en el yogur desnatado comercial. Esta diferencia encontrada en la sinéresis inicial es significativa.

En estudios previos, se indica que son necesarios  $3 \text{ U mTG} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína para lograr yogures sin suero (Kuraishi *et al.*, 2001).

En el presente estudio, se obtiene el mismo resultado con tan solo  $0.5 \text{ U mTG} \cdot \text{g}^{-1}$ . Esto, posiblemente, es a causa de que en esta investigación se mide la actividad de la mTG antes de su uso y que en el trabajo citado dosifican la mTG en función de la actividad declarada por el fabricante. Teniendo en cuenta que la actividad de la mTG disminuye con el tiempo, probablemente en dicha investigación se sobreestima la concentración de la mTG.

El efecto de la mTG sobre el suero libre, también se observa en otros estudios (Lorenzen *et al.*, 2002; Myllärinen *et al.*, 2007; Carić *et al.*, 2011). La sinéresis residual (sinéresis.r) se mide después de la centrifugación y no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes yogures. El efecto de la mTG, tanto en el pH como en la actividad de agua de los yogures tampoco es estadísticamente significativa.

Tabla 4.1. Parámetros físico-químicos de los yogures obtenidos por el método de 2 etapas (TG1P0.5), por el método de 1 etapa (TG1S0.5), del desnatado comercial, del entero comercial y del yogur sin TG (Control). Letras diferentes para el mismo parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

Parámetro	TG1P0.5	TG1S0.5	Control	Desnatado	Entero
Sinéresis.i	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.02±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>
Sinéresis.r	0.23±0.02 <sup>a</sup>	0.25±0.03 <sup>a</sup>	0.17±0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.00 <sup>a</sup>
pH	4.28±0.01 <sup>a</sup>	4.40±0.04 <sup>a</sup>	4.28±0.01 <sup>a</sup>	4.20±0.00 <sup>a</sup>	4.21±0.01 <sup>a</sup>
Aw	0.989±0.002 <sup>a</sup>	0.991±0.005 <sup>a</sup>	0.992±0.003 <sup>a</sup>	0.986±0.001 <sup>a</sup>	0.991±0.006 <sup>a</sup>

El método S (TG1S0.5) permite obtener yogures similares a los desnatados comerciales. Por lo tanto, el método S (1 etapa) es nuevamente la mejor elección ya que, desde el punto de vista de la producción industrial, reduce el tiempo de elaboración.

Usando 0.5 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína, se obtienen yogures con textura similar a los yogures desnatados comerciales. Sin embargo, no se logra la textura de los yogures enteros comerciales. Por lo tanto, en la siguiente sección se evalúa el efecto del incremento de la dosis de mTG a 1 o 2 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína.

#### 4.3.2 Evaluación de la dosis de mTG

Los resultados de la evaluación mecánica de la textura en función de la dosis de mTG se muestran en la figura 4.3. Los resultados obtenidos para los yogures comerciales y el yogur sin mTG (Control) también se incluyen con fines comparativos.

Se detectan diferencias estadísticas significativas en la firmeza ( $p=0.0000$ ) en función del yogur. Los valores más bajos se obtienen en las muestras sin mTG. Los yogures con 0.5 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína muestran valores de firmeza más altos que los yogures Control sin mTG, y similares a los de los yogures desnatados comerciales y más bajos que los yogures enteros comerciales. Los yogures con 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína (TG1S) muestran una firmeza similar que la de los yogures desnatados y enteros comerciales. Al aumentar la dosis a 2 U mTG·g<sup>-1</sup>, la firmeza es superior a la obtenida en los yogures comerciales (Figura 4.3a).

La consistencia aumenta con la concentración de mTG (Figura 4.3b), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0000$ ). Se obtienen valores de consistencia superiores a los obtenidos en yogures comerciales enteros (8643 N·s) utilizando 2 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína (11010 N·s). En estudios con helados, otros autores también encontraron que, al aumentar la dosis de mTG, se logra un aumento en la consistencia (Rossa *et al.*, 2011).

También, se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la cohesividad ( $p=0.0000$ ). El valor más alto de cohesividad se obtiene usando 1 U mTG·g<sup>-1</sup>. El aumento a 2 U mTG·g<sup>-1</sup> no conlleva un aumento en el valor de este parámetro (Figura 4.3c).

El índice de viscosidad no cumple con el supuesto de normalidad, por lo tanto, se aplica el test de Kruskal-Wallis y el test de Wilcoxon con la corrección de Bonferroni, que es un método bastante conservador en cuanto a la identificación de diferencias estadísticamente significativas. Usando este test, los valores para el índice de viscosidad muestran que las diferencias no son estadísticamente significativas para las diferentes dosis de mTG ya que el índice de viscosidad es similar para todos los yogures (Figura 4.3d). Estos resultados no están en sintonía con otros estudios previos en los que se observa que el aumento de la concentración de mTG conlleva un incremento de la viscosidad del yogur (Bönisch *et al.*, 2007; Ilić *et al.*, 2008).

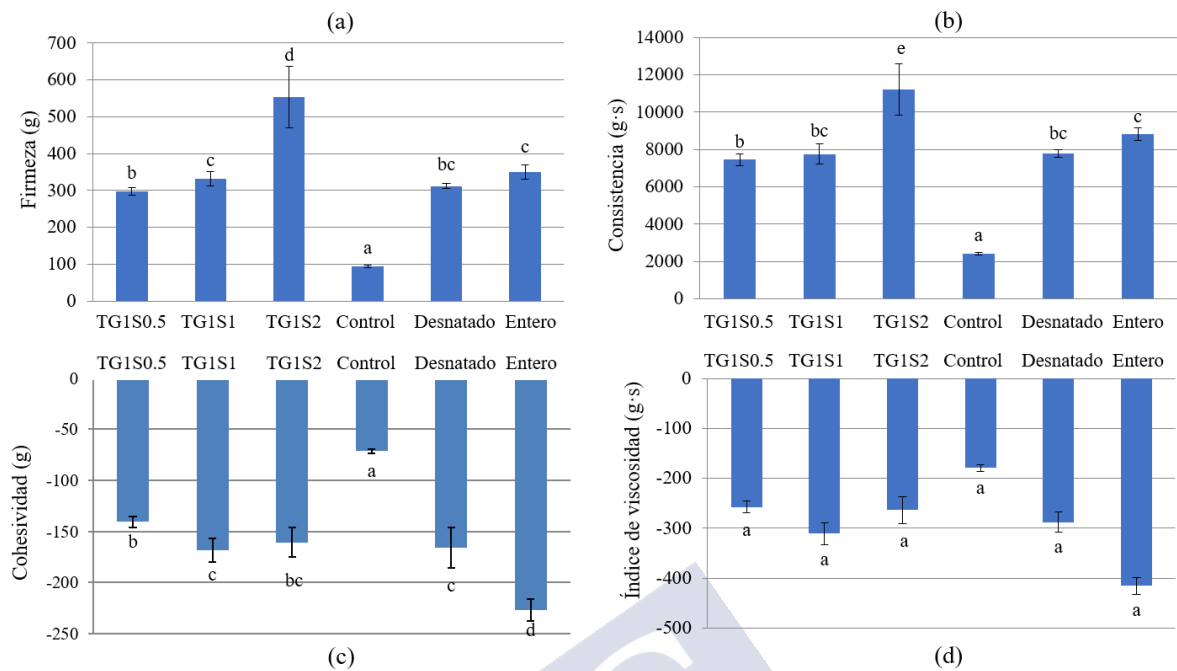


Figura 4.3. Parámetros de textura mecánica de los yogures obtenidos por el método de 1 etapa usando diferentes dosis de mTG (0.5, 1 y 2 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína) (TG1S0.5, TG1S1 y TG1S2, respectivamente), de yogures esteros comerciales, de yogures desnatados comerciales y del yogur sin mTG (Control). Letras diferentes para el mismo parámetro indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Los resultados de del resto de los parámetros determinados de los yogures se muestra en la tabla 4.2.

Tabla 4.2. Parámetros físico-químicos de los yogures obtenidos por el método de 1 etapa usando diferentes dosis de mTG (0.5, 1 y 2 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína) (TG1S0.5, TG1S1 y TG1S2, respectivamente), de yogures esteros comerciales, de yogures desnatados comerciales y del yogur sin mTG (Control). Letras diferentes para el mismo parámetro indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Parámetro	TG1S0.5	TG1S1	TG1S2	Control	Desnatado	Entero
Sinéresis.i	0.00±0.000 <sup>a</sup>	0.00±0.000 <sup>a</sup>	0.00±0.000 <sup>a</sup>	0.01±0.001 <sup>b</sup>	0.01±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>
Sinéresis.r	0.25±0.03 <sup>a</sup>	0.28±0.03 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.00 <sup>a</sup>
pH	4.40±0.04 <sup>a</sup>	4.23±0.01 <sup>a</sup>	4.59±0.01 <sup>a</sup>	4.28±0.01 <sup>a</sup>	4.200±0.00 <sup>a</sup>	4.21±0.01 <sup>a</sup>
Aw	0.991±0.002 <sup>a</sup>	0.988±0.001 <sup>a</sup>	0.995±0.009 <sup>a</sup>	0.992±0.003 <sup>a</sup>	0.986±0.001 <sup>a</sup>	0.991±0.006 <sup>a</sup>

La sinéresis.i (sinéresis inicial) es significativamente diferente en los yogures Control sin mTG y en los yogures desnatados comerciales en comparación con los yogures con mTG. Por tanto, una ventaja del uso de la mTG es que no se observa sinéresis inicial. Sin embargo, las diferencias en la sinéresis residual entre los yogures analizados no son estadísticamente significativas.

Los valores de pH de los yogures no se ven afectados por la adición de mTG a ninguna dosis. Esto concuerda con un estudio previo donde no se observan diferencias en el pH entre un yogur Control y otro tratado con 2 U mTG·g<sup>-1</sup> (Farnsworth *et al.*, 2006). La actividad de agua no se ve afectada por la adición de mTG a ninguna dosis.

Otros estudios muestran diferencias significativas entre yogures Control y yogures con 1, 2 o 3 U mTG·g<sup>-1</sup> en la viscosidad, la firmeza, la adhesividad, el pH y la sinéresis residual (Domagała *et al.*, 2013). En un estudio previo (Kuraishi *et al.*, 2001), se observa que son necesarias dosis superiores a 5 U mTG·g<sup>-1</sup> para aumentar la fuerza del gel, aunque, nuevamente,

y tal como se ha comentado previamente, estas altas dosis de mTG pueden deberse al hecho de que los autores no miden la actividad real en el momento de realizar los experimentos, sino que consideran la actividad declarada por el proveedor y, posiblemente, usen una actividad de mTG menor.

En general, hay pocas diferencias estadísticamente significativas entre el uso de 1 o 2 U mTG·g<sup>-1</sup> (TG1S1 y TG1S2). Por lo tanto, se selecciona 1 U mTG·g<sup>-1</sup> (TG1S1), ya que permite obtener yogures con propiedades similares a los yogures comerciales con una cantidad menor de enzima.

#### **4.3.3 Evaluación del origen de la mTG**

En este apartado, se procede a comparar el efecto de diferentes tipos de mTG. La mTG comercial Activa YG suministrada por Ajinomoto Co. Inc. (Tokio, Japón) se denomina TG1 y la mTG obtenida en nuestro laboratorio, siguiendo el proceso descrito en la patente española ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012), se denomina TG2. La dosis utilizada es la seleccionada en el apartado anterior, 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína.

Los resultados de la evaluación de la textura mecánica de los yogures adicionados de las diferentes mTGs, se muestran en la figura 4.4. Los resultados de los yogures comerciales también se incluyen con fines comparativos.

Se detectan diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros ( $p=0.0000$ ). La firmeza de los yogures elaborados con la mTG propia (TG2) es significativamente superior a la obtenida para TG1 y a la obtenida para los yogures comerciales (Figura 4.4a). Lo mismo ocurre con la consistencia (Figura 4.4b), ya que la consistencia de los yogures con la mTG propia es significativamente mayor que la de los yogures desnatados y enteros comerciales.

La cohesividad de los yogures TG2S1 (producidos con la mTG propia) es similar a la de los yogures enteros comerciales. La cohesividad de los yogures TG1S1 (producidos con Activa YG) es similar a la de los yogures desnatados comerciales (Figura 4.4c). Lo mismo ocurre con el índice de viscosidad (Figura 4.4d). Los yogures elaborados con las mTGs muestran índices de viscosidad similares a los yogures enteros comerciales.

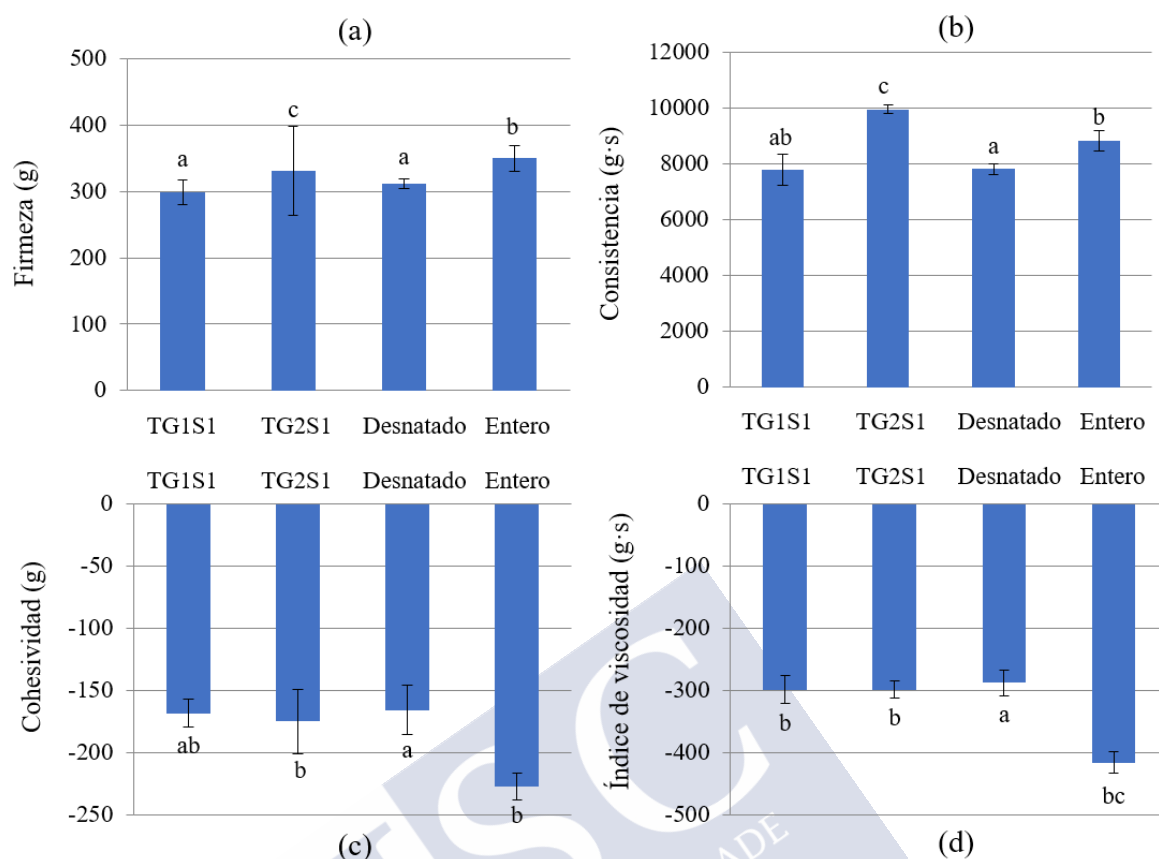


Figura 4.4. Parámetros de textura mecánica de los yogures obtenidos usando mTG de diferentes orígenes (TG1 es Activa YG y TG2 es nuestra propia mTG) por el método de 1 etapa (S) y 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína, de los yogures desnatados y de los yogures enteros comerciales. Letras diferentes para el mismo parámetro indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Los valores del resto de los parámetros determinados de los yogures elaborados con los 2 tipos de mTG se muestran en la tabla 4.3.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en función del origen de la mTG en los diferentes parámetros analizados. Se observa que la sinéresis inicial (sinéresis.i) es significativamente diferente en los yogures con mTG, en comparación con los yogures comerciales, ya que que los yogures que llevan mTG no presentan suero libre.

Tabla 4.3. Parámetros físico-químicos de los yogures obtenidos usando mTG de diferentes orígenes (TG1 es Activa YG y TG2 es nuestra propia mTG) por el método de 1 etapa (S) y 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína, de los yogures desnatados y de los yogures enteros comerciales. Letras diferentes para el mismo parámetro indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

Parámetro	TG1S1	TG2S1	Desnatado	Entero
Sinéresis.i	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.01±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>
Sinéresis.r	0.28±0.03 <sup>a</sup>	0.31±0.04 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>a</sup>	0.17±0.01 <sup>a</sup>
pH	4.23±0.01 <sup>a</sup>	4.51±0.01 <sup>a</sup>	4.20±0.00 <sup>a</sup>	4.21±0.01 <sup>a</sup>
Aw	0.988±0.001 <sup>a</sup>	0.989±0.005 <sup>a</sup>	0.986±0.001 <sup>a</sup>	0.991±0.006 <sup>a</sup>

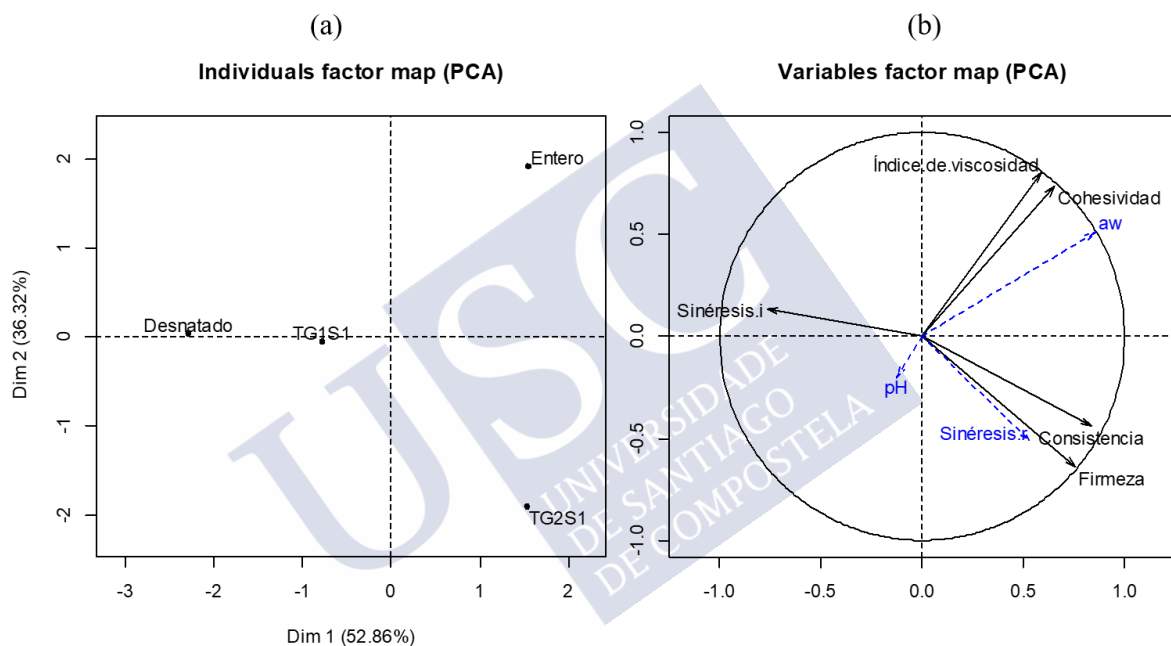
Los resultados del PCA realizado, se presentan en la figura 4.5. Los gráficos que representan las 2 dimensiones del PCA muestran las diferencias entre las muestras. El primer componente principal (CP1) tiene el valor propio más alto, de 2.64, y representa el 52.9% de la

variabilidad en el conjunto de datos. El segundo CP (CP2) tiene un valor propio de 1.81 y representa el 36.3% de la varianza, lo cual supone la mayor fracción de la variabilidad general.

La consistencia muestra la mayor contribución en el CP1 (26.6%), seguida de la sinéresis inicial (22.2%) y la firmeza (21.8%). El índice de viscosidad presenta la contribución más pequeña (13.2%) en el CP1, pero la más alta en CP2 (35.9%), siendo el parámetro con más contribución considerando ambos componentes en conjunto (CP1 y CP2).

En base a ello, los yogures comerciales desnatados y el yogur adicionado de mTG comercial (TG1S1) están en un grupo, mientras que las otras muestras están en grupos separados.

La explicación a la separación de la muestra TG2S1 (mTG propia) respecto a la TG1S1 (mTG comercial) es que es más firme que la TG1S1 y puede ser debido a que la mTG comercial lleva excipientes y la mTG propia es pura, sin excipientes.



**Figura 4.5. Análisis de Componentes principales (PCA) para los yogures obtenidos usando mTG de diferentes orígenes (TG1S1 es Activa YG y TG2S1 es nuestra propia mTG) por el método de 1 etapa (S) y 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína, de los yogures desnatados y de los yogures enteros comerciales-**

En general, teniendo en cuenta las pocas diferencias detectadas en los parámetros de textura instrumental y en las características físico-químicas analizadas en los diferentes yogures, se selecciona la mTG propia como la más adecuada, en una dosis de 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína para obtener yogures bajos en grasa con propiedades similares a las del yogur comercial entero.

#### 4.4 CONCLUSIONES

- En general, no hay diferencias significativas entre los 2 métodos de adición de la mTG.
- Se selecciona el método de adición simultánea de la mTG y el cultivo iniciador (método S) porque no requiere una etapa adicional que aumenta el tiempo necesario para la producción de yogur con mTG.
- La dosis de mTG establecida es de 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína ya que los yogures no muestran grandes diferencias con los yogures con 2 U mTG·g<sup>-1</sup>. El uso de la mitad de la dosis de mTG implica una reducción de los costes.

- Se selecciona la mTG propia como más adecuada.
- La incorporación de la mTG es una herramienta a considerar para reemplazar los estabilizantes y texturizantes en la producción de yogur desnatado porque mejora la textura y evita la sinéresis.

#### 4.5 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al MICINN (España) por el apoyo financiero de este trabajo (Project RTC2014-1835-2) y a los fondos FEDER de la Unión Europea.

#### 4.6 BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Zárate, P., Aguilar-Zárate, M., Carrillo Inungaray, M.L., Portilla Rivera, O.M. & Alonso, J. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4, 1-17.

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.

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

Carić, M.Đ., Iličić, M.D., Hrnjez, D. V & Ranogajec, M.I. (2011). The optimisation of temperature for transglutaminase activation in probiotic yoghurt production. *Prehrambena Industrija*, 22, 16-20.

Chang, C.-H., Kong, B.-H. & Zhao, X.H. (2014). Quality attributes of the set-style yoghurt from whole bovine milk as affected by an enzymatic oxidative cross-linking. *CyTA-Journal of Food*, 12, 249-255.

Directiva 89/107/CEE del Consejo de 21 de diciembre de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano. *Diario Oficial*.

Domagała, J., Wszolek, M., Tamime, A.Y. & Kupiec-Teahan, B. (2013). The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research*, 112, 154-161.

Escobar, D., Arcia, P., Curutchet, A., Pelaggio, R., Urrestarazu, P. & Márquez Romero, R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Innotec*, 9, 24-30.

Faergemand, M., Otte, J. & Qvist, K.B. (1998). Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, 8, 715-723.

Farnsworth, J.P., Li, J., Hendricks, G.M. & Guo, M.R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65, 113-121.

FEN (2016). *La leche como vehículo de salud para la población*. Edita: Fundación Española de Nutrición (FEN) y Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT).

Gauche, C., Tomazi, T. & Bordignon-luiz, M.T. (2008). Polimerização Das Proteínas Do Leite Por Transglutaminase: Modificação das propriedades funcionais e aplicação em produtos lácteos. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 26, 111-122.



- Gerrard, J.A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 389-397.
- Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C.M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *The Biochemical journal*, 368, 377-96.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.
- Iličić, M.D., Carić, M.D., Milanović, S.D., Dokić, L.P., Duric, M.S., Bošnjak, G.S. & Duraković, K.G. (2008). Viscosity changes of probiotic yoghurt with transglutaminase during storage. *Acta Periodica Technologica*, 39, 11-19.
- Iličić, M.D., Milanović, S.D., Kanurić, K.G., Vukić, V.R. & Hrnjez, D. V. (2013). The effect of processing parameters on the structure of fermented milk products with transglutaminase addition. *Acta Periodica Technologica*, 321, 67-74.
- Kruskal, W.H. & Wallis, A.W. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47, 583-621.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17, 221-246.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Giosafatto, C. V. L., Sorrentino, A., & Porta, R. (2008). Transglutaminase in food biotechnology. *Research Signpost*, 37/661, 185-211.
- Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.
- Motoki, M. & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.
- Myllärinen, P., Buchert, J. & Autio, K. (2007). Effect of transglutaminase on rheological properties and microstructure of chemically acidified sodium caseinate gels. *International Dairy Journal*, 17, 800-807.
- Nakagawa, S. (2004). A farewell to Bonferroni: the problems of low statistical power and publication bias. *Behavioral Ecology*, 15, 1044-1045.
- Partanen, R., Autio, K., Myllärinen, P., Lille, M., Buchert, J. & Forsell, P. (2008). Effect of transglutaminase on structure and syneresis of neutral and acidic sodium caseinate gels. *International Dairy Journal*, 18, 414-421.
- Romeih, E.A., Abdel-Hamid, M. & Awad, A.A. (2014). The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt. *Dairy Science and Technology*, 94, 297-309.
- Rossa, P.N., Burin, V.M. & Bordignon-Luiz, M.T. (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.
- Rossa, P.N., Sá, E.M.F. de, Burin, V.M. & Bordignon-Luiz, M.T. (2011). Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 29-34.

Ruxton, G.D. & Beauchamp, G. (2008). Time for some a priori thinking about post hoc testing. *Behavioral Ecology*, 19, 690-693.

Şanlı, T. (2015). Effects of using transglutaminase and fat replacer on functional properties of non-fat yoghurt | Transglutaminaz ve yağ İkame maddesi kullanımının yağsız yoğurdun fonksiyonel nitelikleri üzerine etkileri. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21, 907-913.

Şanlı, T., Şenel, E., Sezgin, E. & Benli, M. (2014). The effects of using transglutaminase, exopolysaccharide-producing starter culture and milk powder on the physicochemical, sensory and texture properties of low-fat set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 237-245.

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.

Shi, J., Han, Y.-P. & Zhao, X.H. (2017a). Quality attributes of set-style skimmed yoghurt affected by the addition of a cross-linked bovine gelatin. *CyTA-Journal of Food*, 15, 320-325.

Shi, J., Li, D. & Zhao, X.H. (2017b). Quality attributes of the set-style skimmed yoghurt containing enzymatic cross-linked or thermal polymerized whey protein isolate. *CyTA-Journal of Food*, 6337, 1-7.

Tamjidi, F., Nasirpour, A. & Shahedi, M. (2012). Physicochemical and sensory properties of yogurt enriched with microencapsulated fish oil. *Food science and Technology International*, 18, 381-390.

Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).

Velázquez, G., Miranda-Luna, P., López-Echevarría, G., Vázquez, M., Torres, J.A. & Ramírez, J.A. (2008). Effect of pacific whiting wash water proteins on Alaska pollack surimi gels. *Journal of Texture Studies*, 39, 296-308.

Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics*, 1, 80-83.

Wróblewska, B., Kaliszewska, A., Kołakowski, P., Pawlikowska, K. & Troszyńska, A. (2011). Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 215-227.



## 5. EVALUACIÓN SENSORIAL DE UN YOGUR DESNATADO PRODUCIDO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA Y COMPARACIÓN CON PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

### Resumen

Tras evaluar las características físico-químicas en el capítulo 4, se propone en este capítulo evaluar el efecto, a nivel sensorial, de la aplicación de transglutaminasa (mTG) en la elaboración de yogur firme desnatado.

Al igual que en el capítulo 4, se evalúan 2 métodos diferentes de adición de la mTG (adición previa a la fermentación o adición simultánea con el cultivo iniciador), 3 niveles de dosis (0.5, 1 y 2 U·mTG g<sup>-1</sup> de proteína) y 2 mTG de diferentes orígenes (una comercial y otra de producción propia).

Los resultados no muestran diferencias significativas entre los métodos de adición de la mTG en las características sensoriales de los yogures obtenidos.

Se selecciona la adición simultánea de mTG con el cultivo, ya que no requiere etapas adicionales, lo que supone un ahorro de tiempo, recomendando como dosis más adecuada 1 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína.

Apenas se detectan diferencias debido al origen de la mTG. Se observan algunas diferencias en los descriptores de densidad, sabor amargo y sinéresis en comparación con los yogures desnatados y enteros comerciales, aunque no son estadísticamente significativas.

Se estudian, además, las correlaciones entre los parámetros sensoriales obtenidos y los parámetros físico-químicos analizados en el capítulo anterior, incluyendo también en la comparativa yogures desnatados y enteros.

Se ha encontrado una correlación positiva y significativa de la firmeza sensorial con la firmeza instrumental, la consistencia, la cohesividad y con el índice de viscosidad. También hay una correlación positiva y significativa entre la persistencia sensorial y el índice de viscosidad instrumental.

La mTG puede usarse como un sustituto de texturizantes y estabilizantes en la producción de yogur desnatado, manteniendo unas buenas propiedades sensoriales y evitando la sinéresis.

**Palabras Clave:** transglutaminasa; yogur; evaluación sensorial; textura

---

Este capítulo está publicado en: *García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019). Sensory evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99, 2088-2095 (Anexo 2).*

## 5.1 INTRODUCCIÓN

Los consumidores demandan nuevos productos lácteos bajos en grasa con las mismas propiedades sensoriales que los productos enteros (Romeih *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017a,b).

La obtención de muchos productos lácteos se basa en la gelificación de las proteínas. Los geles de proteínas del yogur están formados por enlaces no covalentes débiles que se obtienen por acidificación de la leche como consecuencia de la adición de un cultivo iniciador. Hasta el momento, no es factible obtener geles estables mediante modificación química debido a la potencial toxicidad o a las reacciones secundarias no deseadas. La modificación enzimática es la vía más adecuada para obtener geles lácteos como el yogur o el queso (Faergemand *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2014).

Las transglutaminasas son un grupo de enzimas que catalizan reacciones de reticulación entre grupos  $\gamma$ -carboxamida de los residuos de glutamina y los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina. Las transglutaminasas están ampliamente distribuidas en la naturaleza (Griffin *et al.*, 2002).

La producción industrial de transglutaminasa microbiana (mTG) permite su uso en la industria alimentaria. La mTG es activa en una amplia gama de temperaturas y es estable en el rango de pH habitual que presentan los alimentos durante su procesado (pH 5-9). Además, su actividad es calcio-independiente (Ando *et al.*, 1989).

La mTG es adecuada para mejorar características importantes de alimentos proteicos (Motoki and Seguro, 1998; Kuraishi *et al.*, 2001; Mariniello *et al.*, 2008; Aguilar-Zárate *et al.*, 2012). En diferentes trabajos se ensaya la utilización de mTG en la elaboración de alimentos proteicos como derivados de la carne (Castro-Briones *et al.*, 2009; Martelo-Vidal *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014), del pescado (Martelo-Vidal *et al.*, 2016) o en productos lácteos (Gerrard, 2002; Şanlı *et al.*, 2011; Rossa *et al.*, 2012; Semeniuc *et al.*, 2016).

Como algunas de las características de textura y la sinéresis de los yogures bajos en grasa o desnatados difieren de las de los yogures enteros (Carić *et al.*, 2011), la aplicación de la mTG permite obtener yogures bajos en grasa manteniendo unas buenas características sensoriales (Iličić *et al.*, 2013). La aplicación de la mTG en las proteínas lácteas es una vía efectiva para mejorar las propiedades físicas de los productos lácteos (Gauche *et al.*, 2008; Escobar *et al.*, 2014). Por lo tanto, la mTG tiene un gran potencial como sustituto de los sólidos que se añaden a la leche como fortificantes o los estabilizantes que se usan frecuentemente en la producción de yogur firme.

La mTG pierde su actividad a pH 5, quedando completamente inactiva a pH 4.3. Esto es muy importante en relación a los aspectos regulatorios. En EE.UU., la *Food and Drug Authority* (FDA) declara que la mTG es *Generally Recognized as Safe* (GRAS). En la actualidad, en Europa, las enzimas se consideran como un coadyuvante de acuerdo con la Directiva 89/107/CE. Esto significa que la mTG no debe detectarse en el producto final.

Se proponen 2 métodos para la aplicación de la mTG en la producción de yogur: (i) añadir la mTG simultáneamente con el cultivo iniciador, o (ii) añadir la mTG antes de la etapa de fermentación (Bönisch *et al.*, 2007). En el primer método la mTG es inactivada gradualmente con la disminución del pH. El segundo método, requiere una etapa adicional para la incubación con la mTG y otra para su inactivación térmica antes de la adición del cultivo iniciador. En el primer método, la mTG actúa a un pH decreciente y en el segundo la mTG actúa a un pH constante (Wróblewska *et al.*, 2011).

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la aplicación de mTG en la elaboración de yogur desnatado para determinar si se pueden obtener parámetros sensoriales similares a los del yogur entero. Por tanto, se procede a evaluar la influencia del método de adición de la mTG (en una etapa previa o simultáneamente a la fermentación), de la dosis de la mTG y del origen

de la misma. Para ello, se determinan las características sensoriales de los yogures mediante la utilización de un panel de catadores entrenado y validado a tal fin. Finalmente, y tras el establecimiento de los perfiles sensoriales de los productos elaborados, se realizará la comparación con las características físico-químicas de los mismos (García-Gómez *et al.*, 2018), recogidas en el capítulo 4.

## 5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.2.1 Materiales

Se utiliza leche UHT desnatada comercial, con un 0.2% de material grasa y un contenido proteico total de 3.1%, para la elaboración de yogur. La mTG comercial Activa YG® es suministrada por Ajinomoto Co. Inc. (Tokio, Japón). La actividad declarada es de  $100 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ , aunque la actividad real medida antes de su aplicación es de  $77 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ . Esta mTG se denomina TG1 en este estudio. Una segunda mTG (TG2) es producida en nuestro laboratorio, siguiendo el procedimiento descrito en la patente ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012), siendo la actividad medida de  $440 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ .

Tanto para medir la actividad de la mTG antes de su aplicación, como para determinar la actividad residual de la misma en el producto final, se usa un procedimiento colorimétrico utilizando espectrofometría NanoDrop®, usando N- $\alpha$ -CBZ-gln-gly (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato. La curva de calibración se elabora usando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). Una unidad de transglutaminasa se define como la formación de un  $1 \mu\text{mol}$  de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato en 1 min a  $37^\circ\text{C}$  (Grossowicz *et al.*, 1950).

### 5.2.2 Elaboración de los yogures

Se evalúan 2 procedimientos, uno con 2 etapas (adición de la mTG antes de la adición del cultivo iniciador) y otro con 1 etapa (adición simultánea de la mTG con el cultivo iniciador). Para el método de 2 etapas (P), se añade la mTG a la leche UHT y se deja actuar durante 12 h a  $4^\circ\text{C}$ . Se calienta a  $80^\circ\text{C}$  durante 5 min para inactivar la enzima y se enfría a la temperatura de fermentación ( $42^\circ\text{C}$ ), a continuación, se sigue el mismo proceso que para la muestra Control. Para el método de 1 etapa (S), la etapa de incubación con la mTG y la fermentación son simultáneas. La enzima se inactiva gradualmente con la disminución del pH. El proceso posterior es igual que para el yogur Control. Al finalizar la fermentación, no se detecta actividad de la mTG en las muestras.

Para la evaluación de la dosis, se elaboran yogures usando la TG1 con unas dosis de 0.5, 1 o  $2 \text{ U mTG} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína. La nomenclatura utilizada para estos yogures es TG1S0.5, TG1S1 y TG1S02, respectivamente. El método seleccionado y la dosis de mTG se evalúa de la misma manera para la TG2.

Para la elaboración de los yogures sin mTG (Control) se usa la misma leche UHT desnatada. Para ello, la leche se calienta a  $42^\circ\text{C}$  y se inocula el cultivo láctico liofilizado (LyoCulture Dairy, BDF Natural Ingredients, Girona, España) a razón de  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de leche y se agita a 600 rpm durante 5 min. Los envases de yogur (125 g) se llenan con la leche inoculada y se incuban a  $42^\circ\text{C}$  durante 8 h. Después de la incubación, las muestras se enfrían y se almacenan a  $4^\circ\text{C}$  durante 12 h.

Las pruebas sensoriales y físico-químicas se realizan 4 días después de la producción de los yogures.

### 5.2.3 Evaluación sensorial

Se aplica un análisis descriptivo cuantitativo (QDA) para la evaluación sensorial. El conjunto de descriptores se desarrolla de acuerdo con los procedimientos estandarizados de análisis sensorial (UNE 87027:2018, 2018), tomando como referencia estudios previos acerca de la evaluación sensorial de yogur (Harper *et al.*, 1991; Ott *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2003; Gámbaro *et al.*, 2004; Kip *et al.*, 2006; Soukoulis *et al.*, 2007; Coggins *et al.*, 2008; Janhøj *et al.*, 2008; Johansen *et al.*, 2008; González-Tomás *et al.*, 2009; Guggisberg *et al.*, 2009; Gallina *et al.*, 2012; Hasani *et al.*, 2016; Hasani *et al.*, 2017) y basándose en el conocimiento previo del panel entrenado.

Finalmente, se seleccionan 15 descriptores, siguiendo las directrices de la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR) (UNE 87027:2018, 2018), 8 de los cuales se cuantifican utilizando una escala no estructurada de 10 cm y los 7 descriptores restantes se evalúan mediante una escala de 2 puntos (presencia/ausencia).

La definición y el procedimiento de evaluación para cada atributo se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Definición y procedimiento de evaluación de los atributos.

Descriptor	Definición	Escala y referencias	
Olor a suero	Olor percibido al sostener el yogur cerca de la nariz causado por el suero presente en el yogur.	0=Suero de yogur diluido en agua (1:4)	10=Suero de yogur
Firmeza	Fuerza requerida para insertar en el yogur una cucharilla.	0=Natillas	10=Flan de vainilla
Densidad	Percepción de compacidad y cuerpo después de introducir la muestra en la boca y comprimirla entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Petit Suisse
Creмосidad	Percepción de consistencia y suavidad al desplazar la muestra entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Mayonesa
Sabor ácido	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de ácido cítrico.	0=0.13 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico	10=0.60 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico
Sabor amargo	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de cafeína.	0=0.03 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína	10=0.1 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína
Astringencia	Efecto de contracción o desecación en la superficie de la boca causado por soluciones acuosas diluidas de ácido tánico.	0=Ausencia	10=0.1 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido tánico
Persistencia	Tiempo de persistencia de la sensación olfativa vía nasal indirecta/gustativa percibida después de que el producto ha sido tragado o expulsado.	0=<20 s	10=>60 s
Suero libre (sinétesis)	Observación visual del suero libre en la superficie del yogur.	Presencia	Ausencia
Presencia de granos	Presencia de granulosidad.	Presencia	Ausencia
Aroma a leche	Aroma asociado con la leche cruda.	Presencia	Ausencia
Aroma a nata	Aroma asociado con la nata.	Presencia	Ausencia
Aroma a mantequilla	Aroma asociado con la mantequilla.	Presencia	Ausencia
Aromas extraños	Precepción de aromas asociado a defectos (recocado,...).	Presencia	Ausencia
Regusto	Sensación olfativa vía nasal indirecta/gustativa percibida después de tragar o expulsar el producto.	Presencia	Ausencia

Tanto la evaluación sensorial como la validación del panel se realizan en una sala de cata a temperatura ambiente (UNE-EN ISO 13299:2017, 2017) utilizando los procedimientos descritos en las normas estandarizadas para el análisis sensorial (UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014, 2014). La validación del panel se refiere al control de la eficacia de los catadores al realizar la evaluación sensorial.

Inicialmente, se seleccionan y entrenan 15 catadores (UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014:2014), aunque finalmente por motivos de disponibilidad solo 9 de ellos participan en la caracterización sensorial de estos yogures. Los catadores cuentan con experiencia previa en análisis de productos lácteos y reciben 20 h de entrenamiento específico en yogur. Las evaluaciones se realizan siguiendo un diseño experimental de bloques completos al azar, en el que cada muestra se codifica con números de 3 dígitos y se presenta a cada catador en orden aleatorio en vasos de plástico de 125 g. Los catadores se enjuagan la boca con agua entre muestra y muestra.

Las pruebas sensoriales se realizan 4 días después de la elaboración del yogur y los catadores en cada sesión de cata evalúan por duplicado las muestras de cada yogur.

#### **5.2.4. Análisis estadístico**

Todos los cálculos estadísticos se realizan utilizando el software IBM SPSS Statistics 20 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) y el lenguaje de programación R (R Core Team, 2018). Las diferencias con un nivel de significación de  $p < 0.05$  se consideran significativas.

Las diferencias en las características sensoriales cuantitativas (olor a suero, firmeza al insertar la cuchara, densidad, cremosidad, sabor ácido, sabor amargo, astringencia y persistencia) para cada muestra se analizan mediante un análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores (muestra y catador). Cuando la diferencia entre las muestras es estadísticamente significativa, se estudian las comparaciones por parejas mediante el test *post hoc* de Tukey. Previamente se verifica la normalidad dentro de cada muestra y la homogeneidad de las varianzas. Cuando las variables no cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza, se aplican los test de Welch y de Games-Howell. Cuando las variables no cumplen con el supuesto de normalidad, se aplica el test de Friedman.

Las diferencias en las características sensoriales cualitativas (suero libre, granulosidad, aroma a leche, aroma a nata, aroma a mantequilla, aromas extraños y regusto) se estudian utilizando el test de independencia Chi-cuadrado de Pearson y el test de Friedman.

Se realiza también un análisis multivariante para comparar muestras, utilizando un Análisis de Componentes Principales (PCA) y estableciendo elipses de confianza. El PCA reduce significativamente el número de dimensiones permitiendo una proyección gráfica en un número reducido de dimensiones.

La validación del panel se lleva a cabo aplicando un análisis ANOVA de 3 factores (Bárcenas *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2015), considerando 3 muestras (factor muestra) 2 sesiones (factor sesión) y las valoraciones de panel (factor catador). Se consideraron las interacciones de factores muestra:catador, catador:sesión y muestra:sesión.

Se calculan los coeficientes de correlación de Pearson para estudiar posibles correlaciones entre los atributos sensoriales y las medidas físico-químicas realizadas en un estudio previo (García-Gómez *et al.*, 2018).



## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1 Validación del panel

La validación del panel es un paso clave para garantizar la fiabilidad de los datos sensoriales obtenidos. Además, puede ayudar a reducir el tiempo de entrenamiento y permite proporcionar una herramienta de autocorrección a los catadores (Álvarez and Blanco, 2000; Périnel, 2004; Findlay *et al.*, 2006). Se aplica un análisis de varianza (ANOVA) en el que el catador, la muestra, la sesión y sus interacciones se consideran como factores. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Valores del estadístico F para los diferentes descriptores del análisis de varianza de 3 factores (catador, muestra y sesión) con interacción. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

Parámetro	Catador	Muestra	Sesión	Muestra:Catador	Muestra:Sesión	Catador:Sesión
Olor a suero	3.4588**	5.8495**	0.0057	1.1584	1.1220	0.3282
Firmeza	6.1248***	0.0344	1.0009	1.6611	1.8706	0.8998
Densidad	7.2611***	30.0202***	0.4320	3.2855**	1.6506	1.0834
Creemosidad	29.7456***	34.0056***	0.2647	1.8836*	2.5486	1.2019
Sabor ácido	11.3413***	9.9230***	0.2040	0.6221	1.1473	0.5266
Sabor amargo	10.8694***	3.2721	0.7019	1.3899	0.4601	0.5026
Astringencia	13.3486***	7.4162**	0.3257	1.4969	0.9547	1.9580
Persistencia	28.2682***	2.8039	0.3249	3.5520	1.0113	0.8561

Para evaluar la capacidad de discriminación entre productos, un efecto de la muestra significativo indica que los catadores son capaces de discriminar entre muestras. El p-valor obtenido indica que el panel es capaz de discriminar entre muestras en la mayoría de los descriptores, excepto en la firmeza, el sabor amargo y la persistencia. Por otro lado, el efecto principal del catador fue significativo para todos los descriptores. Este hecho está relacionado principalmente con la tendencia de los catadores a usar diferentes partes de la escala para evaluar las muestras (Carbonell *et al.*, 2002); si bien, no afecta a la interpretación de los resultados ya que este efecto está controlado estadísticamente por el modelo ANOVA (Lea *et al.*, 1997).

La fiabilidad del panel se analiza mediante la interacción muestra:catador, que evalúa la homogeneidad que hay entre las evaluaciones del panel para cada muestra (Bárceñas *et al.*, 2000). Los efectos significativos sugieren una falta de homogeneidad. Los únicos p-valores significativos se obtienen para la densidad y la cremosidad, lo que implica una falta de consenso del panel en la evaluación de las muestras en función de estos descriptores. Sin embargo, es interesante analizar el comportamiento individual de cada catador, para identificar aquellos catadores con evaluaciones heterogéneas (Carbonell *et al.*, 2007), es decir, es necesario analizar la fiabilidad individual para mejorar el consenso del panel.

Para evaluar la fiabilidad individual de los catadores, respecto a las variables densidad y cremosidad, se estudia la desviación estándar del residuo del modelo, que explica la interacción catador:sesión, lo que permite evaluar la capacidad de cada catador para calificar cada muestra, siempre de manera similar, es decir, en las diferentes sesiones. Las desviaciones estándar del residuo del modelo para cada catador fueron en muchos casos inferiores a 1.00, esto indica que, en general, los catadores son capaces de hacer juicios reproducibles utilizando puntuaciones similares para evaluar las muestras en las 2 sesiones. Como consecuencia, se

decide corregir y reentrenar a algunos catadores en los atributos densidad y cremosidad para mejorar la fiabilidad de sus juicios.

Se obtienen efectos no significativos para las interacciones muestra:sesión y sesión:catador. Este hecho pone de manifiesto que cada muestra se evalúa de la misma manera en ambas sesiones y que los juicios de los catadores son similares en ambas sesiones.

### **5.3.2 Evaluación del método de adición de la mTG**

Se comparan las características sensoriales de los yogures obtenidos a partir de leche comercial UHT desnatada, adicionada de mTG (TG1) en una dosis de  $0.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  por los 2 métodos (en 1 o en 2 etapas; mTGP0.5 y mTGS0.5) descritos anteriormente. En la comparación se incluyen un yogur Control elaborado sin adición de mTG (Control) a partir de la misma leche utilizada para la elaboración de los otros 2 yogures y yogures desnatados y enteros comerciales.

En la figura 5.1 se muestran los valores medios de los resultados obtenidos para los descriptores cuantitativos en las diferentes muestras de yogur analizadas.

La firmeza obtenida para los yogures comerciales es mayor que la de los yogures con mTG elaborados por ambos métodos (TG1P0.5 y TG1S0.5). Los resultados de firmeza de las muestras con mTG obtenidas por ambos métodos (TG1P0.5 y TG1S0.5) son estadísticamente similares a los de los yogures desnatados y enteros comerciales y diferentes a los del yogur Control. El valor más bajo para la firmeza se obtiene en los yogures sin mTG (Control). Esto es previsible, debido a que estos yogures no se fortifican con proteínas lácteas como es habitual en la elaboración de los yogures comerciales.

El yogur desnatado comercial muestra una cremosidad más baja que el yogur entero comercial. Los yogures elaborados con mTG, elaborados por el método de 2 etapas (mTGP0.5) muestran valores de cremosidad similares a los yogures enteros comerciales. Existen diferencias estadísticamente significativas entre la densidad de los yogures con mTG obtenidos por el método de 1 sola etapa (TG1S0.5) y la obtenida para los yogures entero comercial y para el Control.

En cuanto a los descriptores sensoriales cualitativos, existen diferencias estadísticamente significativas en los descriptores sinéresis ( $p < 0.0001$ ) y granulosidad ( $p < 0.0001$ ). En ninguna de las muestras con mTG los catadores observan suero libre y únicamente perciben granulosidad en las muestras comerciales.

Estos resultados son comparables con los publicados en la literatura sobre el uso de mTG en yogures desnatados o bajos en grasa, en los que se indica que se mejoran algunas propiedades sensoriales hasta el nivel de ser similares a las de los yogures enteros.

Los resultados sensoriales se comparan con los resultados físico-químicos publicados previamente (García-Gómez *et al.*, 2018).

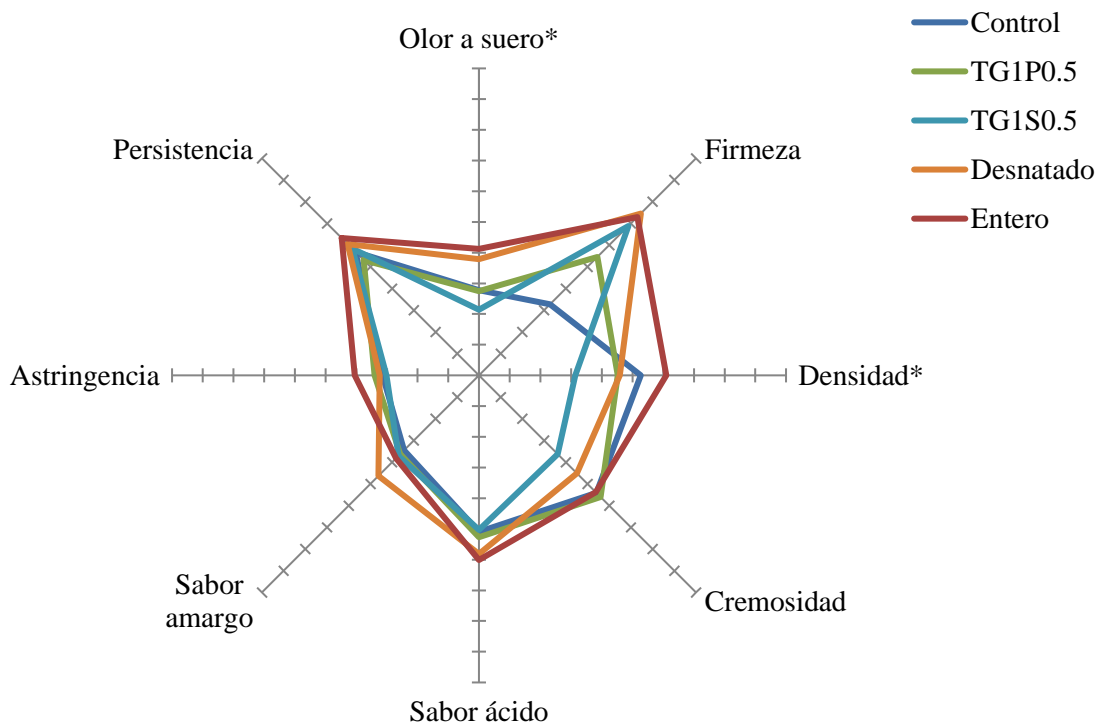


Figura 5.1. Perfil sensorial del yogur obtenido con mTG por el método de 2 etapas (TG1P0.5), por el método de 1 etapa (TG1S0.5), del desnatado comercial, del entero comercial y del yogur sin mTG (Control). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

En la tabla 5.3 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros físico-químicos y sensoriales. La firmeza sensorial muestra una correlación positiva y significativa ( $p < 0.01$ ) con la firmeza instrumental, con la consistencia, con la cohesividad y con el índice de viscosidad. También hay una correlación positiva y significativa ( $p < 0.05$ ) entre la persistencia sensorial y el índice de viscosidad instrumental.

Tabla 5.3. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros sensoriales (primera fila) y las características físico-químicas (primera columna). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

Parámetro	Olor a suero	Firmeza	Densidad	Cremosidad	Sabor ácido	Sabor amargo	Astringencia	Persistencia
Sinéresis inicial	0.142	-0.095	0.163	0.116	0.104	0.227	-0.184	-0.063
pH	-0.279	-0.161	-0.331	-0.314	-0.034	-0.016	-0.230	-0.097
Aw	-0.461	-0.069	0.089	-0.113	0.257	0.043	-0.396	-0.383
Sinéresis residual	-0.321	-0.267	-0.059	-0.121	0.023	-0.017	-0.012	-0.110
Firmeza (instrumental)	0.224	0.605**	-0.181	-0.071	-0.021	-0.092	0.163	0.381
Consistencia	0.243	0.601**	-0.167	-0.065	-0.010	-0.078	0.160	0.383
Cohesividad	0.227	0.507**	-0.003	0.129	-0.010	-0.068	0.330	0.388
Índice de viscosidad	0.204	0.437*	0.067	0.124	0.040	-0.060	0.318	0.417*

Los resultados del presente estudio muestran que hay un efecto positivo sobre las características sensoriales al adicionar mTG, si bien no hay diferencias importantes en los yogures elaborados por uno u otro método de adición de la mTG. El efecto positivo de la mTG también se ha confirmado en otros productos lácteos (Rossa *et al.*, 2012). Otros estudios concluyen también que la suplementación con proteínas lácteas u otros estabilizantes no es necesaria cuando se usa mTG ya que se obtienen yogures con unas propiedades sensoriales adecuadas (Özer *et al.*, 2007). Otros investigadores concluyen que las mejores características de textura se obtienen con la adición simultánea de la mTG y el cultivo iniciador (Mahmood and Sebo, 2012).

### 5.3.3 Evaluación de la dosis de mTG

En base a los resultados anteriores (apartado 5.3.2), el método de 1 etapa (S) se selecciona para evaluar a continuación la influencia de la dosis de mTG (0.5, 1 o 2 U mTG·g<sup>-1</sup> de proteína) sobre las características sensoriales de los yogures. Los yogures Control, sin adición de mTG, los yogures comerciales desnatados y los yogures enteros también son evaluados con fines comparativos.

La figura 5.2 muestra los valores medios de los atributos sensoriales. Las principales diferencias se observan en los parámetros de textura, tales como la firmeza (p=0.0000), la densidad (p=0.0157) y la cremosidad (p=0.0021) y en el olor a suero (p=0.0181). Los yogures TG1S2 muestran una densidad y una cremosidad significativamente menores que los yogures enteros comerciales. El aumento en la concentración de mTG disminuye la percepción de cremosidad, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas entre las diferentes concentraciones de mTG testadas. La firmeza de TG1S2 muestra los valores más elevados, siendo un 1 punto más alta que en los yogures comerciales enteros. Los yogures Control muestran una firmeza significativamente más baja que cualquiera de los demás yogures testados. Sin embargo, en otros estudios las muestras con mTG se describen como más cremosas que las muestras de yogur obtenidas con leche no tratada con la enzima (Lorenzen *et al.* (2002).

Todos los yogures con mTG muestran valores similares en el olor a suero. Sin embargo, los valores de olor a suero de los yogures con mTG son significativamente más bajos que los obtenidos, tanto para los yogures desnatados comerciales, como para los enteros comerciales. Lorenzen *et al.* (2002) observaron que el olor a suero es menor que en los yogures no tratados

La comparación por parejas muestra diferencias estadísticamente significativas para los valores de los parámetros de astringencia y de sabor amargo. El yogur con la mayor concentración de mTG (TG1S2) es significativamente menos amargo que el yogur comercial desnatado y menos astringente que el yogur comercial entero. La percepción del sabor ácido y de la cremosidad también es menor, aunque no de manera significativa. Estos resultados concuerdan con otros hallazgos observados en la literatura, en los que se detecta un menor sabor ácido en los yogures con mTG (Lorenzen *et al.*, 2002; Tsevdou *et al.*, 2013). Esto puede deberse al efecto inhibitorio de la mTG sobre el crecimiento del cultivo iniciador o a la producción de grupos de amonio por la reacción de la mTG (Motoki and Seguro, 1998). Esto ralentiza el desarrollo de la acidez y la producción de acetaldehído (Özer *et al.*, 2007).

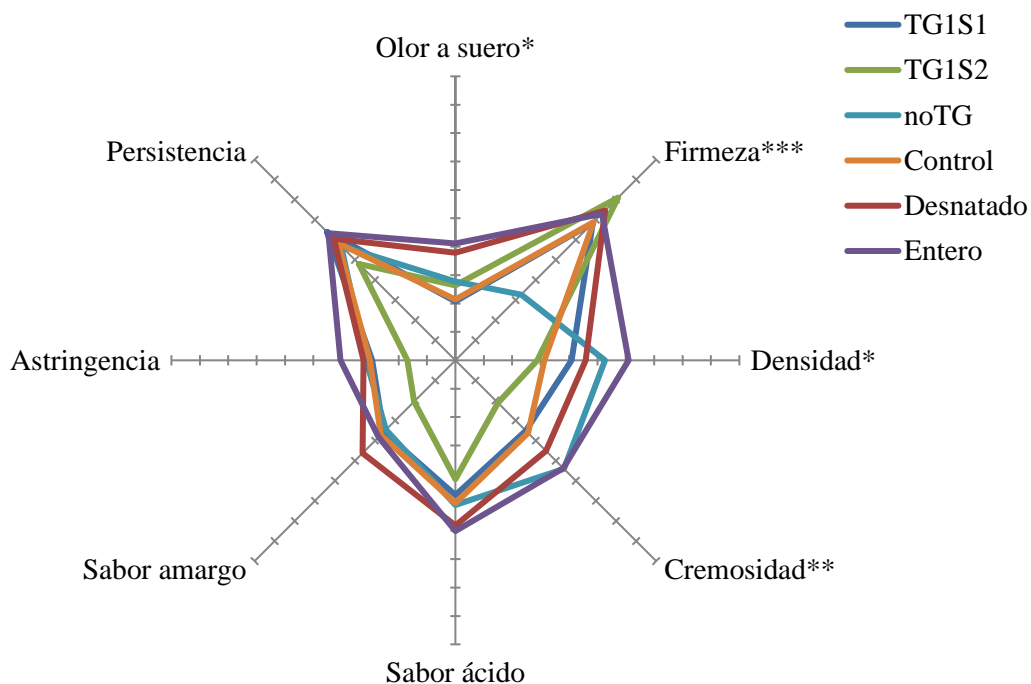


Figura 5.2. Perfil sensorial del yogur obtenido por el método de 1 etapa (TG1S) usando diferentes dosis de TG1 (0.5, 1 o 2 U·g<sup>-1</sup> de proteína; TG1S0.5, TG1S1 y TG1S2, respectivamente), del yogur desnatado comercial, del entero comercial y del yogur sin mTG (Control). Niveles de significación: \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.0001.

En los descriptores sensoriales cualitativos, se detectan diferencias estadísticamente significativas en el descriptor de sinéresis ( $p<0.0001$ ), ya que los yogures con mTG no tienen suero libre. En otro estudio, un yogur con mTG muestra también una superficie seca en comparación con un yogur sin tratar, que muestra suero libre en su superficie (Lorenzen *et al.*, 2002).

También se observan diferencias estadísticamente significativas en la granulosidad ( $p<0.0001$ ). Únicamente se observa granulosidad en los yogures comerciales. Sin embargo, Lorenzen *et al.* (2002) describen las muestras con mTG como más granulosas.

El aroma de los yogures no se ve afectado por la adición de mTG. Estos resultados están de acuerdo con otro estudio, en el que no se encuentra una relación entre el aroma a leche y la adición de mTG a diferentes concentraciones (Mahmood and Sebo, 2012).

Los resultados sensoriales se comparan con los resultados físico-químicos publicados previamente (García-Gómez *et al.*, 2018). La tabla 5.4 muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros físico-químicos y sensoriales para la evaluación de la dosis de mTG. La firmeza sensorial muestra una correlación positiva y significativa ( $p<0.01$ ) con la firmeza instrumental, la consistencia, la cohesión y el índice de viscosidad. Se encuentra también, una correlación positiva y significativa ( $p<0.01$ ) entre la densidad sensorial y la firmeza y la consistencia instrumental y entre la cremosidad sensorial y la firmeza instrumental y la sinéresis inicial.

Tabla 5.4. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros sensoriales (primera fila) y las características físico-químicas (primera columna). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

Parámetro	Olor a suero	Firmeza	Densidad	Creemosidad	Sabor ácido	Sabor amargo	Astringencia	Persistencia
Sinéresis inicial	0.186	-0.268	0.360*	0.445**	0.261	0.366*	-0.058	-0.068
pH	-0.052	0.109	-0.350	-0.339	-0.232	-0.300	-0.374	-0.031
Aw	0.011	-0.026	0.159	0.046	0.156	-0.088	-0.395	-0.201
Sinéresis residual	-0.286	-0.079	-0.281	-0.465*	-0.171	-0.157	-0.091	0.004
Firmeza (instrumental)	-0.101	0.550**	-0.527**	-0.502**	-0.389*	-0.436*	-0.073	0.126
Consistencia	-0.041	0.577**	-0.470**	-0.421*	-0.288	-0.358	0.018	0.234
Cohesividad	0.176	0.505**	-0.080	-0.003	-0.066	-0.117	0.379*	0.301
Índice de viscosidad	0.186	0.383*	0.063	0.099	0.043	0.014	0.422*	0.339

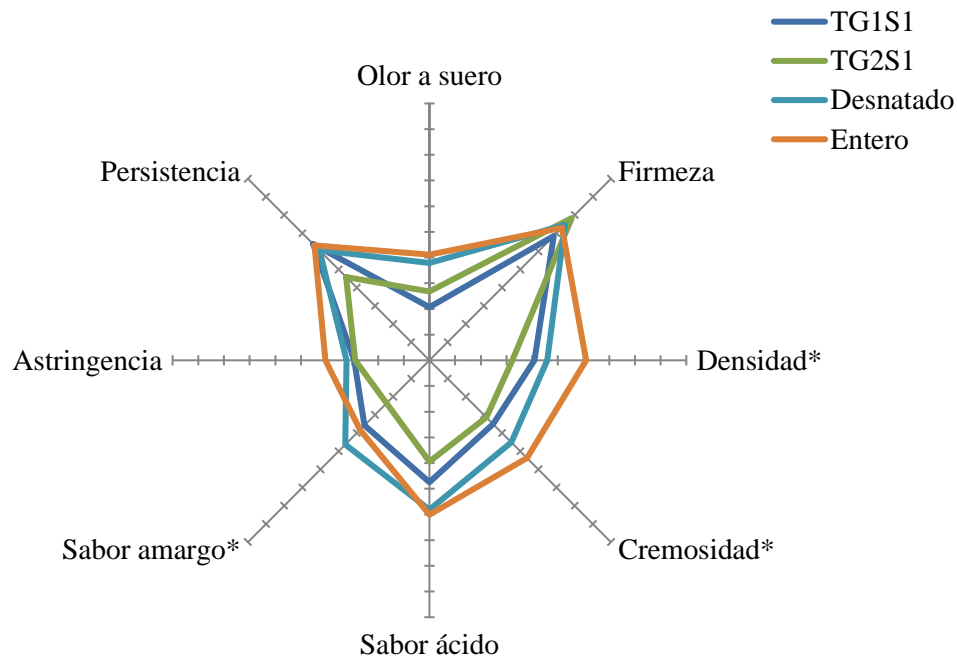
En general, un aumento en la dosis de la mTG aumenta la firmeza y disminuye la densidad y la percepción de cremosidad. Una dosis alta de TG disminuye la percepción del sabor amargo y astringencia. Por lo tanto, se considera que la dosis de mTG más adecuada es alrededor de 1 U·g<sup>-1</sup> de proteína.

### 5.3.4 Evaluación del origen de la mTG

No hay estudios previos que comparen diferentes orígenes de mTG. Para este propósito, se realizaron 2 lotes de yogures, uno con TG1 (mTG comercial) y otro con TG2 (mTG propia). En ambos lotes, se utiliza la dosis de mTG (1 U·g<sup>-1</sup> de proteína) y el método de 1 sola etapa (S), seleccionados previamente. Estos lotes se identifican como TG1S1 y TG2S1.

La Figura 5.3 muestra los resultados del análisis sensorial en función del origen de la mTG.

Se observan diferencias estadísticamente significativas en la densidad ( $p=0.0298$ ), en la cremosidad ( $p=0.04861$ ) y en el sabor amargo ( $p=0.0090$ ). La densidad de los yogures TG1S1 y TG2S1 es similar entre sí y, en el caso de TG2S1, significativamente menor que la de los yogures comerciales enteros. El test de comparación por parejas muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en la cremosidad. El sabor amargo de los yogures TG1S1 y TG2S1 es similar entre sí y a la puntuación obtenida para los yogures comerciales enteros, pero es significativamente menor que el de los yogures comerciales desnatados. En los descriptores sensoriales cualitativos, hay diferencias estadísticamente significativas únicamente en el descriptor de sinéresis ( $p < 0.0001$ ) debido a que los yogures con mTG no muestran suero libre.



**Figura 5.3.** Perfil sensorial de los yogures obtenido usando mTGs de origen diferente (TG1 es Activa YG y TG2 es mTG propia) por el método de 1 sola etapa (S) y una dosis de  $1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína y de yogures desnatados y enteros comerciales. Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

La Figura 5.4 muestra el análisis multivariante (PCA y elipses de confianza) para los parámetros cuantitativos. Las 2 primeras dimensiones explican alrededor del 94.5% de la varianza.

La muestra TG2S1 es significativamente más firme y muestra valores más bajos en la densidad, en el sabor amargo y en la persistencia que TG1S1, mientras que TG1S1 muestra los valores más bajos para el olor a suero, pero sin diferencias significativas con TG2S1. La percepción de cremosidad también es menor en ambas, pero sin diferencias significativas entre ellas.

Las diferencias entre las características sensoriales de los yogures adicionados de mTGs con diferente origen pueden deberse a impurezas o excipientes presentes en la mTG comercial. Los yogures comerciales muestran los valores más altos en cremosidad y en densidad. También presentan un olor a suero más intenso y un mayor sabor ácido.

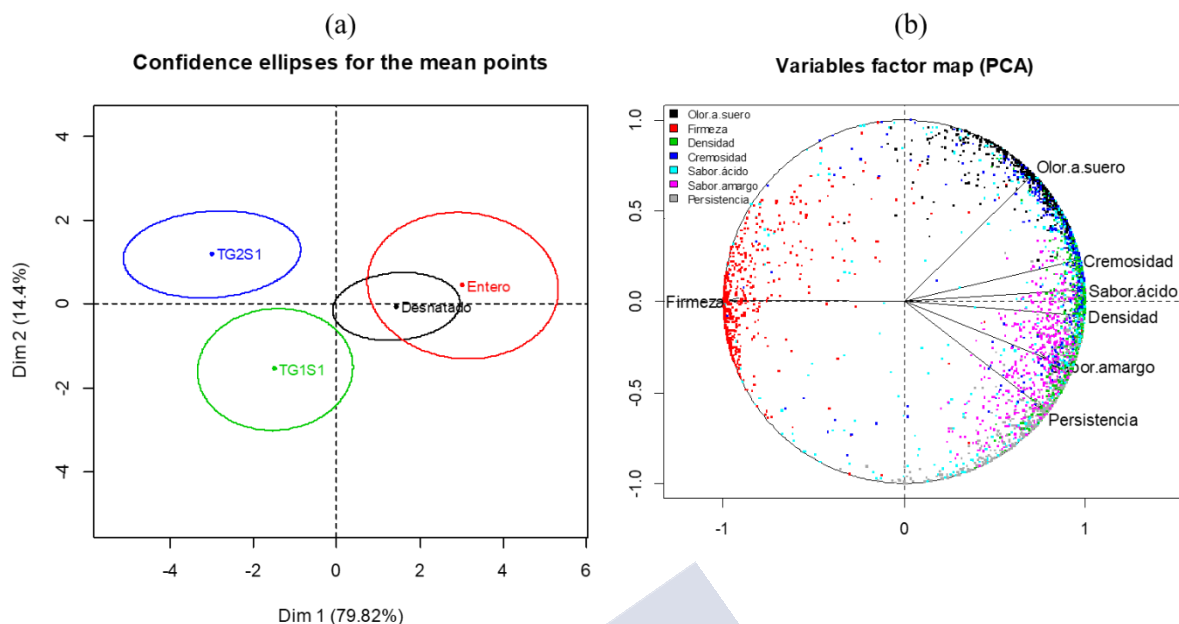


Figura 5.4. Análisis multidimensional del perfil sensorial para evaluar el efecto del origen de la mTG.

Los resultados sensoriales se comparan con los resultados físico-químicos publicados previamente (García-Gómez *et al.*, 2018). En la tabla 5.5 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson entre las características sensoriales y los parámetros físico-químicos e instrumentales para la evaluación del efecto del origen de la mTG. Únicamente, el olor a suero, desde un punto de vista sensorial muestra una correlación negativa y significativa ( $p < 0.05$ ) con la consistencia instrumental y la cremosidad con la sinéresis residual.

Tabla 5.5. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros sensoriales (primera fila) y las características físico-químicas (primera columna). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

Parámetros	Olor a suero	Firmeza	Densidad	Cremosidad	Sabor ácido	Sabor amargo	Astringencia	Persistencia
Sinéresis inicial	0.284	0.138	0.124	0.310	0.228	0.329	-0.063	0.031
pH	-0.049	0.336	-0.234	-0.338	-0.198	-0.262	-0.127	-0.203
aw	-0.217	-0.057	0.466	0.247	0.111	0.211	-0.165	-0.367
Sinéresis residual	-0.381	-0.070	-0.424	-0.577*	-0.328	-0.353	-0.115	-0.029
Firmeza (instrumental)	-0.405	-0.206	-0.289	-0.435	-0.318	-0.381	-0.113	0.021
Consistencia	-0.453*	-0.209	-0.188	-0.414	-0.198	-0.376	-0.098	0.147
Cohesividad	0.026	0.063	0.084	0.055	-0.176	-0.285	0.348	-0.018
Índice de viscosidad	0.118	0.020	0.196	0.121	-0.043	-0.126	0.353	0.083

En general, teniendo en cuenta las pequeñas diferencias a nivel sensorial, la mTG propia (TG2), se selecciona como la mejor enzima a una dosis de  $1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína para obtener un yogur desnatado con propiedades sensoriales similares a las del yogur entero comercial.



## 5.4. CONCLUSIONES

- Apenas se detectan diferencias estadísticamente significativas en las características sensoriales de los yogures en función del método de adición de la mTG (1 o 2 etapas), por lo que se selecciona el método de la adición simultánea de mTG con el iniciador de cultivo lo que supone un menor tiempo de elaboración y, por lo tanto, una reducción de costes.
- La dosis recomendada de mTG es de  $1 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína, ya que las características sensoriales de estos yogures respecto a los elaborados con una dosis de  $2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína son similares y mejores que cuando se adiciona  $0.5 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína.
- Se observan pequeñas diferencias en las características sensoriales de los yogures debido al origen de la mTG. Esto podría deberse a las impurezas o a los excipientes presentes en una de las formulaciones de las 2 mTGs estudiadas. En consecuencia, se selecciona la mTG propia por proporcionar yogures más firmes y con menor sabor amargo.
- La incorporación de la mTG es una herramienta a considerar para reemplazar los estabilizantes y texturizantes en la producción de yogur desnatado.

## 5.5 AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al MICINN (España) por el apoyo financiero de este trabajo (Project RTC2014-1835-2) y a los fondos FEDER de la Unión Europea y a la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia (ES) (Project # ED431B 2016/009).

## 5.6 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Zárate, P., Aguilar-Zárate, M., Carrillo Inungaray, M.L., Portilla Rivera, O.M. & Alonso, J. (2012). Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4, 1-17.
- Álvarez, P. & Blanco, M.A. (2000). Reliability of the sensory analysis data of a panel of tasters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 409-418.
- 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.
- Bárcenas, P., Pérez-Elortondo, F.J. & Albisu, M. (2000). Selection and screening of a descriptive panel for ewes milk cheese sensory profiling. *Journal of Sensory Studies*, 15, 79-99.
- Bönisch, M.P., Huss, M., Weitzl, K. & Kulozik, U. (2007). Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties. *International Dairy Journal*, 17, 1360-1371.
- Carbonell, I., Izquierdo, L. & Costell, E. (2002). Sensory Profiling of Cooked Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*): Sensory Evaluation Procedures and Panel Training. *Food Science and Technology International*, 8, 169-177.
- Carbonell, L., Izquierdo, L. & Carbonell, I. (2007). Sensory analysis of Spanish mandarin juices. Selection of attributes and panel performance. *Food Quality and Preference*, 18, 329-341.
- Carić, M.Đ., Iličić, M.D., Hrnjez, D. V & Ranogajec, M.I. (2011). The optimisation of temperature for transglutaminase activation in probiotic yoghurt production. *Prehrambena industrija*, 22, 16-20.

- Castro-Briones, M., Calderón, G.N., Velázquez, G., Salud-Rubio, M., Vázquez, M. & Ramírez, J.A. (2009). Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 221-234.
- Chang, C.-H., Kong, B.H. & Zhao, X.H. (2014). Quality attributes of the set-style yoghurt from whole bovine milk as affected by an enzymatic oxidative cross-linking. *CyTA-Journal of Food*, 12, 249-255.
- Coggins, P.C., Schilling, M.W., Kumari, S. & Gerrard, P.D. (2008). Development of a sensory lexicon for conventional milk yogurt in the United States. *Journal of Sensory Studies*, 23, 671-687.
- Escobar, D., Arcia, P., Curutchet, A., Pelaggio, R., Urrestarazu, P. & Márquez Romero, R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Innotec*, 9, 24-30.
- Faergemand, M., Otte, J. & Qvist, K.B. (1998). Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, 8, 715-723.
- Findlay, C.J., Castura, J.C., Schlich, P. & Lesschaeve, I. (2006). Use of feedback calibration to reduce the training time for wine panels. *Food Quality and Preference*, 17, 266-276.
- Gallina Toschi, T., Bendini, A., Barbieri, S., Valli, E., Cezanne, M.L., Buchecker, K. & Canavari, M. (2012). Organic and conventional nonflavored yogurts from the Italian market: Study on sensory profiles and consumer acceptability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2788-2795.
- Gámbaro, A., Giménez, A.M., Varela, P. & Penna, E.W. De. (2004). Association of Strawberry Yogurt Sensory Properties with product composition By Procrustes Analysis. *Journal of Sensory Studies*, 19, 293-306.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á. Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.
- Gauche, C., Tomazi, T. & Bordignon-luiz, M.T. (2008). Polimerização Das Proteínas Do Leite Por Transglutaminase: Modificação Das Propriedades Funcionais E. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 26, 111-122.
- Gerrard, J.A. (2002). Protein-protein crosslinking in food: Methods, consequences, applications. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 389-397.
- González-Tomás, L., Bayarri, S. & Costell, E. (2009). Inulin-enriched dairy desserts: Physicochemical and sensory aspects. *Journal of Dairy Science*, 92, 4188-4199.
- Griffin, M., Casadio, R. & Bergamini, C.M. (2002). Transglutaminases: nature's biological glues. *The Biochemical journal*, 368, 377-96.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.
- Guggisberg, D., Cuthbert-Steven, J., Piccinali, P., Bütikofer, U. & Eberhard, P. (2009). Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yoghurt as influenced by inulin addition. *International Dairy Journal*, 19, 107-115.
- Harper, S.J., Barnes, D.L., Bodyfelt, F.W. & McDaniel, M.R. (1991). Sensory ratings of

- commercial plain yoghurts by consumer and descriptive panels. *Journal of Dairy Science*, 74, 2927-2935.
- Hasani, S., Khodadadi, I. & Heshmati, A. (2016). Viability of *Lactobacillus acidophilus* in rice bran-enriched stirred yoghurt and the physicochemical and sensory characteristics of product during refrigerated storage. *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 2485-2492.
- Hasani, S., Sari, A. A., Heshmati, A., & Karami, M. (2017). Physicochemical and sensory attributes assessment of functional low-fat yogurt produced by incorporation of barley bran and *Lactobacillus acidophilus*. *Food Science & Nutrition*, 5, 875-880.
- Iličić, M.D., Milanović, S.D., Kanurić, K.G., Vukić, V.R. & Hrnjez, D. V. (2013). The effect of processing parameters on the structure of fermented milk products with transglutaminase addition. *Acta Periodica Technologica*, 321, 67-74.
- Janhøj, T., Bom Frøst, M. & Ipsen, R. (2008). Sensory and rheological characterization of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids*, 22, 798-806.
- Johansen, S.M.B., Laugesen, J.L., Janhøj, T., Ipsen, R.H. & Frøst, M.B. (2008). Prediction of sensory properties of low-fat yoghurt and cream cheese from surface images. *Food Quality and Preference*, 19, 232-246.
- Kip, P., Meyer, D. & Jellema, R.H. (2006). Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. *International Dairy Journal*, 16, 1098-1103.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17, 221-246.
- Lea, P., Næs, T. & Rødbotten, M. (1997). *Analysis of Variance for Sensory Data*. Ed. John Wiley & Sons Inc. Chichester. ISBN 0-471-96750-5.
- Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.
- Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2012). Improvement of Yogurt Properties by Microbial Transglutaminase. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 8, 333-342.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Giosafatto, C. V. L., Sorrentino, A., & Porta, R. (2008). Transglutaminase in food biotechnology. *Research Signpost*, 37/661, 185-211.
- Martelo-Vidal, M.J., Fernández-No, I.C., Guerra-Rodríguez, E. & Vázquez, M. (2016). Obtaining reduced-salt restructured white tuna (*Thunnus alalunga*) mediated by microbial transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 341-348.
- Martelo-Vidal, M., Mesas, J. & Vázquez, M. (2012). Low-salt restructured fish products from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) with texture resembling turkey breast. *Food science and technology international*, 18, 251-259.
- Martínez, M.A., Robledo, V., Velázquez, G., Ramírez, J.A., Vázquez, M. & Uresti, R.M. (2014). Effect of precooking temperature and microbial transglutaminase on the gelling properties of blue crab (*Callinectes sapidus*) proteins. *Food Hydrocolloids*, 35, 264-269.
- Motoki, M. & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.

- Oliveira, A.R., Sykes, A. V., Hachero-Cruzado, I., Azeiteiro, U.M. & Esteves, E. (2015). A sensory and nutritional comparison of mussels (*Mytilus sp.*) produced in NW Iberia and in the Armona offshore production area (Algarve, Portugal). *Food Chemistry*, 168, 520-528.
- Ott, A., Hugi, A., Baumgartner, M. & Chaintreau, A. (2000). Sensory investigation of yogurt flavor perception: Mutual influence of volatiles and acidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 441-450.
- Özer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A. & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- Pereira, R.B., Singh, H., Munro, P.A. & Luckman, M.S. (2003). Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. *International Dairy Journal*, 13, 655-667.
- Périnel, E. (2004). Panel performance and number of evaluations in a descriptive sensory study. *Journal of Sensory Studies*, 19, 273-291.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.
- Romeih, E.A., Abdel-Hamid, M. & Awad, A.A. (2014). The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt. *Dairy Science and Technology*, 94, 297-309.
- Rossa, P.N., Burin, V.M. & Bordignon-Luiz, M.T. (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.
- Şanlı, T., Sezgin, E., Devenci, 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.
- Semeniuc, C.A., Rotar, A., Stan, L., Pop, C.R., Socaci, S., Mireşan, V. & Muste, S. (2016). Characterization of pine bud syrup and its effect on physicochemical and sensory properties of kefir. *CyTA-Journal of Food*, 14, 213-218.
- Shi, J., Han, Y.-P. & Zhao, X.-H. (2017a). Quality attributes of set-style skimmed yoghurt affected by the addition of a cross-linked bovine gelatin. *CyTA-Journal of Food*, 15, 320-325.
- Shi, J., Li, D. & Zhao, X.-H. (2017b). Quality attributes of the set-style skimmed yoghurt containing enzymatic cross-linked or thermal polymerized whey protein isolate. *CyTA-Journal of Food*, 6337, 1-7.
- Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R. & Tzia, C. (2007). Industrial Yogurt Manufacture: Monitoring of Fermentation Process and Improvement of Final Product Quality. *Journal of Dairy Science*, 90, 2641-2654.
- Tsevdou, M.S., Eleftheriou, E.G. & Taoukis, P.S. (2013). Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk: Effects on the properties and storage stability of set yoghurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 144-152.
- UNE-ISO 4121:2006. (2006). Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de catadores y catadores expertos. Ed. Asociación Española

de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.

UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.

UNE-EN ISO 13299:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía general para establecer un perfil sensorial. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.

UNE 87027:2018. (2018). Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para la elaboración de un perfil sensorial mediante diferentes enfoques. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.

Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).

Wróblewska, B., Kaliszewska, A., Kołakowski, P., Pawlikowska, K. & Troszyńska, A. (2011). Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 215-227.





## 6. CALIDAD SENSORIAL Y ACEPTACIÓN DEL CONSUMIDOR DE YOGUR DESNATADO PRODUCIDO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA EN UNA PLANTA PILOTO

### Resumen

Los yogures con cantidades bajas de grasa, en muchos casos presentan defectos relacionados con la textura y con la sinéresis, características que son fundamentales para la aceptación del yogur por parte del consumidor.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es obtener información de si la utilización de transglutaminasa microbiana (mTG) en la elaboración del yogur influye en la aceptación y preferencia del consumidor.

Las condiciones de operación (método de aplicación) se seleccionan a partir de los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (capítulos 4 y 5). Mediante la aplicación del software Design Expert de Stat Ease, se estima la concentración óptima de mTG teniendo en cuenta igualmente, los resultados preliminares.

Se elaboran yogures en planta piloto, con leche desnatada pasteurizada y con una dosis de mTG comercial de  $0.76 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  proteína que se adiciona al mismo tiempo que el cultivo iniciador. De forma paralela, se elabora un yogur Control, adicionándole a la leche desnatada leche desnatada en polvo y el cultivo iniciador.

Una vez elaborados los yogures, se someten a la evaluación por parte de grupo de 124 consumidores de yogur seleccionados al azar y por un panel de catadores entrenado ( $n=17$ ) para evaluar las características sensoriales que pueden afectar a la aceptación del consumidor.

Los resultados muestran que el yogur con mTG es más firme y menos cremoso que el yogur Control. El índice de aceptación es del 59.7% para el yogur TG y del 70.5% para el yogur Control, a pesar de éstos resultados los consumidores no muestran un rechazo alto hacia el yogur mTG.

La información obtenida en este estudio puede ser importante para predecir o explicar la respuesta del mercado a los yogures con mTG.

**Palabras Clave:** calidad sensorial; índice de aceptación; riesgo-oportunidad; preferencia; transglutaminasa; yogur.

---

Este capítulo está publicado en: *García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019). Sensory quality and consumer acceptance of skim yoghurt produced with transglutaminase at pilot plant scale. International Journal of Dairy Technology, 72, 388-394. (Anexo 3).*

## 6.1 INTRODUCCIÓN

El yogur es un producto lácteo obtenido por fermentación láctica de la leche. La fermentación se produce mediante la adición de un cultivo iniciador que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. El proceso se lleva a cabo a temperatura controlada, lo que provoca una caída de pH hasta 4.6.

El yogur tiene un papel importante en la dieta diaria ya que suministra nutrientes en forma biodisponible, y ha ganado la aceptación y confianza del consumidor como un alimento saludable ya que presenta beneficios como la mejora en la tolerancia a la lactosa y otros relacionados con el efecto positivo de las bacterias probióticas (Onwulata *et al.*, 1989; Buttriss, 1997). En particular, los yogures con cantidades bajas en grasa proporcionan importantes nutrientes, en cantidades significativas, en relación con su contenido energético y graso, lo que los convierte en un alimento nutricionalmente adecuado (McKinley, 2005; Serafeimidou *et al.*, 2013).

Además de ser saludables, los consumidores esperan obtener placer de la ingesta de alimentos, por lo tanto, los alimentos deben tener buenas características sensoriales (Verbeke, 2006). El yogur es considerado tradicionalmente por los consumidores como un producto satisfactorio y conveniente, con una buena calidad sensorial (Sahan *et al.*, 2008; Loveday *et al.*, 2013). La textura y otras propiedades sensoriales del yogur lo convierten en uno de los productos lácteos fermentados más populares en todo el mundo (Muir *et al.* 1999; Vázquez-Velázquez *et al.* 2018).

La industria alimentaria debe conocer y entender las necesidades, gustos y preferencias de los consumidores. Esto supone comprender cuales son las características sensoriales clave para los consumidores, para así evitar el fracaso en el mercado de un nuevo producto (Grygorczyk *et al.* 2013).

La demanda de yogures bajos en grasa o desnatados está aumentando, pero estos productos tienen unas características sensoriales diferentes a los yogures enteros. Los defectos más comunes están relacionados con la textura y con la sinéresis (Pereira *et al.*, 2006; Lee and Lucey, 2010). Además, la disminución en el contenido graso o su sustitución por agentes texturizantes, puede provocar cambios en la distribución de las moléculas de sabor y aroma dentro del producto y generar diferencias en la percepción de los mismos (Routray and Mishra, 2011).

Debido a que la textura y la sinéresis son fundamentales para la aceptación del yogur, los investigadores estudian el efecto del reemplazo de la grasa por ingredientes lácteos, como son la leche en polvo desnatada, los concentrados de proteínas lácteas y del suero (González-Martínez *et al.*, 2002; Kavas *et al.*, 2003; Yazici and Akgun, 2004; Pereira *et al.*, 2006); aditivos como los gelificantes, los espesantes o los estabilizantes (Lucey and Singh, 1997) y macromoléculas solubles en agua o hidrocoloides como la gelatina, la pectina o la inulina (Everett and McLeod, 2005; Paseephol *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2017a,b). Sin embargo, defectos de textura asociados con el uso de estos ingredientes y/o aditivos son detectados por los consumidores (Guzmán-González *et al.*, 2000; Kavas *et al.*, 2003; Sandoval-Castilla *et al.*, 2004; Lee and Lucey, 2010).

En la fabricación convencional de yogur, el gel de proteína se estabiliza principalmente por interacciones débiles no covalentes (electrostáticas, enlaces de hidrógeno, enlaces hidrófobos).

El uso de la enzima transglutaminasa microbiana (mTG) permite introducir nuevos enlaces covalentes que conllevan la formación de un gel con una estructuras y propiedades diferentes (Schorsch *et al.*, 2000; Farnsworth *et al.*, 2006). Por lo tanto, la mTG es considerada una alternativa efectiva frente a la utilización de los diferentes ingredientes o aditivos empleados



para obtener efectos similares a los que se consigue en los yogures enteros (Yokoyama *et al.*, 2004; Jaros *et al.*, 2006; Özer *et al.*, 2007; Yüksel and Erdem, 2010; Jooyandeh *et al.*, 2015).

La mTG cataliza una reacción de transferencia de grupos acilo entre el grupo carboxiamida de los péptidos unidos a los residuos de glutamina (donantes de acilo) y una variedad de aminas primarias (aceptores de acilo), incluido el grupo amino de los residuos de lisina en ciertas proteínas. En ausencia de sustratos de amina, la mTG cataliza la desamidación de los residuos de glutamina y utiliza las moléculas de agua como aceptores de grupos acilo.

La mTG puede modificar las proteínas mediante la incorporación de grupos amino, por polimerización y por desamidación (Motoki and Seguro, 1998). Debido a su gran potencial para mejorar varias propiedades funcionales de las proteínas, la mTG es usada principalmente para mejorar la textura, la estabilidad y la retención de agua (Dube *et al.*, 2007). Las caseínas de la leche son un sustrato excelente para la mTG (Motoki and Seguro, 1998; Routray and Mishra, 2011).

La evaluación sensorial es una herramienta muy útil para que la empresa alimentaria evalúe la calidad sensorial del producto y la aceptación del mismo por parte del consumidor (Sidel and Stone, 1993; Murray *et al.*, 2001).

La estrategia más aceptable para la evaluación de la calidad sensorial, es realizar 2 tipos de análisis: los test con consumidores (pruebas afectivas o hedónicas) y las pruebas con panel analítico entrenado (pruebas descriptivas o analíticas). Los resultados de la relación entre ambas pruebas (afectivas y descriptivas) sirve para obtener productos con perfiles sensoriales bien adaptados al mercado objetivo, lo que permite a las empresas de alimentos realizar este control, para mejorar la calidad y/o desarrollar nuevos productos (Elortondo *et al.*, 2007; Semeniuc *et al.*, 2016).

Los catadores entrenados pueden describir el producto de manera objetiva, teniendo en cuenta descriptores sensoriales que podrían pasar desapercibidos para los consumidores (Ten Kleij and Musters, 2003; Ishii *et al.*, 2007). Las pruebas afectivas de consumidores, se utilizan para evaluar la aceptación, la preferencia y las expectativas de los consumidores, ya que las respuestas hedónicas están condicionadas por una variedad de factores. Estas respuestas hedónicas juegan un papel importante en la selección y consumo de alimentos (Bayarri *et al.*, 2010). Identificar las características sensoriales clave que afectan o determinan las preferencias del consumidor pueden proporcionar una herramienta muy útil para los fabricantes de alimentos (Masson *et al.*, 2016).

Por tanto, en este estudio se pretende determinar el efecto de una mTG comercial adicionada a un yogur desnatado sobre las características sensoriales y evaluar la aceptación de este producto por parte del consumidor con el objetivo de analizar si el uso de la mTG puede evitar la fortificación del yogur desnatado con leche desnatada en polvo que es el procedimiento habitual utilizado en la industria alimentaria.

## 6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.2.1 Materias primas

La leche desnatada es analizada antes de su uso, obteniendo la siguiente composición: 0.04% de materia grasa, 3.30% de proteína y 9.35% de materia seca total. La mTG (Probind®) es suministrada por BDF Natural Ingredients (Girona, España). La actividad medida antes de su uso es de 66 U·g<sup>-1</sup>.

Tanto para medir la actividad de la mTG antes de su aplicación, como para determinar la actividad residual de la misma en el producto final, se usa un procedimiento colorimétrico utilizando espectrofotometría NanoDrop®, usando N- $\alpha$ -CBZ-gln-gly (Sigma-Aldrich Corp, St.

Louis, MO, EE.UU.) como sustrato. La curva de calibración se elabora usando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). Una unidad de transglutaminasa se define como la formación de un 1  $\mu$ mol de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato en 1 min a 37°C (Grossowicz et al., 1950).

### 6.2.2 Elaboración de los yogures

La fabricación de los yogures se realiza en una planta piloto (Aula de Productos Lácteos, USC, Lugo (noroeste de España)). La leche desnatada (120 L) se divide en 2 lotes, uno de 60 L para elaborar yogur desnatado obtenido con mTG (yogur TG) y el otro, también de 60 L para elaborar el yogur desnatado sin enzima (yogur Control). Para el lote de yogur control, la leche se fortifica con leche desnatada en polvo, para aumentar la materia seca sin aumentar la grasa, añadiéndola antes del tratamiento térmico, tal y como se hace en la fabricación de yogur a nivel industrial. Se mezcla la leche desnatada con la leche desnatada en polvo hasta alcanzar los siguientes valores: 0.05% de materia grasa, 3.80% de proteína y 10.45% de materia seca total.

Para elaborar el yogur con mTG, se usa una dosis de 0.76 U·g<sup>-1</sup> proteína en la leche. La dosis se calcula después de realizar estudios preliminares (García-Gómez *et al.*, 2018, 2019) y optimizar dicha dosis de mTG mediante el software Design Expert de Stat Ease®.

Ambos lotes se pasteurizan a 95°C durante 5 minutos y se homogeneizan a 200+50-bar y, posteriormente, se enfrían a 43°C. El cultivo láctico liofilizado (LyoCulture Dairy, BDF Natural Ingredients, Girona, España) se inocula (0.2 g·L<sup>-1</sup> de leche) y se mezcla con la leche. La adición de la mTG se realiza simultáneamente con el cultivo iniciador. Con la mezcla se llenan los envases de plástico de 125 g y se incuban a 43°C. Cada lote está formado por 360 yogures.

La coagulación de la leche se controla mediante el cambio de pH durante el período de incubación hasta que se alcanza un valor de 4.6. La mTG se inactiva gradualmente con la disminución del pH y no se detecta actividad de la misma en el producto al finalizar la fermentación. Finalmente, los yogures se almacenan en una cámara refrigerada a 4°C.

Los consumidores y el panel entrenado evalúan las muestras una vez transcurridos 4 días del día de fabricación, para permitir el asentamiento de los yogures.

### 6.2.3 Análisis descriptivo cuantitativo

De manera simultánea a las pruebas con consumidores, las muestras son evaluadas por un panel entrenado formado por 17 catadores con experiencia previa en la evaluación sensorial descriptiva de yogur (el número de catadores se incrementó respecto a ensayos anteriores debido a dos nuevas incorporaciones, previo entrenamiento y validación).

Los catadores son seleccionados previamente en función de sus aptitudes sensoriales y su disponibilidad. Los procedimientos de selección y entrenamiento se realizan de acuerdo con las normas internacionales. Posteriormente, los catadores seleccionados reciben entrenamiento en sabores básicos, en olores, en texturas, así como en el uso de escalas (UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014, 2014; Meilgaard et al., 2016). El panel entrenado genera el conjunto de descriptores sensoriales (UNE 87027:2018, 2018), establece las escalas y las referencias para desarrollar el perfil sensorial (UNE-EN ISO 13299:2017, 2017).

La evaluación sensorial descriptiva se realiza mediante un análisis descriptivo cuantitativo (QDA). Los catadores evalúan la intensidad de cada descriptor sensorial para cada muestra, utilizando una escala lineal de 10 cm no estructurada, de acuerdo con las referencias previamente establecidas para cada descriptor sensorial (García-Gómez *et al.*, 2019).

Después de 20 horas de entrenamiento utilizando la ficha de cata que incluye los descriptores sensoriales seleccionados, se valida el panel para garantizar la fiabilidad de los resultados del análisis. La validación del panel proporciona una retroalimentación a cada

catador que permite la autocorrección (UNE-EN ISO 11132:2017, 2017). Las evaluaciones se realizan en una sala de cata que cumple con los estándares para el análisis sensorial (UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014, 2014), equipada con 10 cabinas individuales.

Cada muestra se codifica con un código aleatorio de 3 dígitos y las evaluaciones se realizan de acuerdo con un diseño experimental de bloques completos al azar para evitar posibles influencias en las evaluaciones debidas al orden de presentación de las muestras. Se proporciona agua para enjuagarse entre muestra y muestra. Las muestras se presentan a los catadores en envases de plástico de 125 g. Los catadores disponen de las referencias establecidas para las escalas de cada descriptor en todas las sesiones. Las definiciones y el procedimiento de evaluación de los atributos sensoriales se muestran en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1. Definición y procedimiento de evaluación de los atributos sensoriales.**

Descriptor	Definición	Escala y referencias	
Olor a suero	Olor percibido al sostener el yogur cerca de la nariz causado por el suero presente en el yogur.	0=Suero de yogur diluido en agua (1:4)	10=Suero de yogur
Firmeza	Fuerza requerida para insertar en el yogur una cucharilla.	0=Natillas	10=Flan de vainilla
Densidad	Percepción de compacidad y cuerpo después de introducir la muestra en la boca y comprimirla entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Petit Suisse
Cremosidad	Percepción de consistencia y suavidad al desplazar la muestra entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Mayonesa
Sabor ácido	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de ácido cítrico.	0=0.13 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico	10=0.60 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico
Sabor amargo	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de cafeína.	0=0.03 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína	10=0.17 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína
Astringencia	Efecto de contracción o desecación en la superficie de la boca causado por soluciones acuosas diluidas de ácido tánico.	0=Ausencia	10=0.1 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido tánico
Persistencia	Tiempo de persistencia de la sensación olfativa vía nasal indirecta/gustativa percibida después de que el producto ha sido tragado o expulsado.	0=<20 s	10=>60 s

#### 6.2.4 Análisis con un panel de consumidores

Los consumidores (n=124) son reclutados para realizar la prueba hedónica en la sala de cata (test de laboratorio) situada en la Facultad de Veterinaria en Lugo (noroeste de España). El criterio de reclutamiento es ser consumidor habitual de yogur.

Un 64.5% de los encuestados son mujeres y un 35.5% hombres. En cuanto a la edad, los encuestados entre los 18 y los 39 años representan un 37.9%, los de edad entre los 40 y los 59 años son el 39.5% y el 22.6% tienen más de 60 años.

La presentación de las muestras (TG y Control) se realiza en envases de plástico de 125 g. Las muestras se presentan aleatoriamente, codificadas con 3 dígitos, con una presentación monádica secuencial y utilizando un diseño de bloques completo equilibrado.

Para el test de aceptación, se evalúan, el aspecto, el olor, el sabor, la textura y la aceptabilidad global (Majchrzak *et al.*, 2010), de acuerdo con una escala hedónica estructurada de 9 puntos (1-me disgusta muchísimo, 2-me disgusta mucho, 3-me disgusta, 4-me disgusta ligeramente, 5-ni me gusta ni me disgusta, 6-me gusta ligeramente, 7-me gusta, 8-me gusta mucho and 9-me gusta muchísimo).

Se pregunta también a los participantes sobre los hábitos de compra y sobre la frecuencia y la motivación para el consumo de yogur. También se pregunta a los encuestados sobre su preferencia, si consumirían o si descartarían totalmente alguno de los yogures, así como los motivos para elegirlos o descartarlos.

### **6.2.5. Análisis estadístico**

Todos los cálculos estadísticos se realizan utilizando el software IBM SPSS Statistics 20 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) y el lenguaje R (R Core Team, 2018). Las diferencias a un nivel de  $p < 0.05$  se consideran estadísticamente significativas.

Se aplica el test t de Student para muestras apareadas para evaluar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las características sensoriales, evaluadas por el panel de catadores entrenado, entre el yogur TG y el yogur Control. Previamente, para estudiar si la diferencia de las medias tiene una distribución normal en cada una de las variables cuantitativas, se aplica el test de Shapiro-Wilk. Se considera que presentan una distribución normal cuando el valor p es no significativo ( $p \geq 0.05$ ).

El coeficiente de correlación de rangos de Spearman se aplica para identificar las posibles correlaciones de la apariencia, del olor, del sabor y de la textura con la aceptación global

Las diferencias en las valoraciones de los consumidores entre la muestra con mTG y el Control se estudian mediante el test de rangos con signo de Wilcoxon (Wilcoxon, 1945).

Las medias y las desviaciones estándar se calculan, tanto para el análisis descriptivo cuantitativo como para el test de consumidores, para resumir las respuestas de los catadores, de los consumidores y para calcular los índices de aceptación.

Se realiza un análisis de oportunidades (Rothman, 2009) para estudiar cómo se podría aumentar el grado de aceptación del yogur con mTG modificando algunos de sus descriptores sensoriales.

## **6.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.3.1 Análisis descriptivo cuantitativo**

El perfil sensorial obtenido por el panel entrenado se muestra en la figura 6.1. El yogur con mTG muestra una mayor firmeza que el yogur Control. El yogur con mTG es menos cremoso y menos denso. La muestra control obtiene puntuaciones altas en el olor a suero y es más ácida y más amargo que el yogur con mTG.

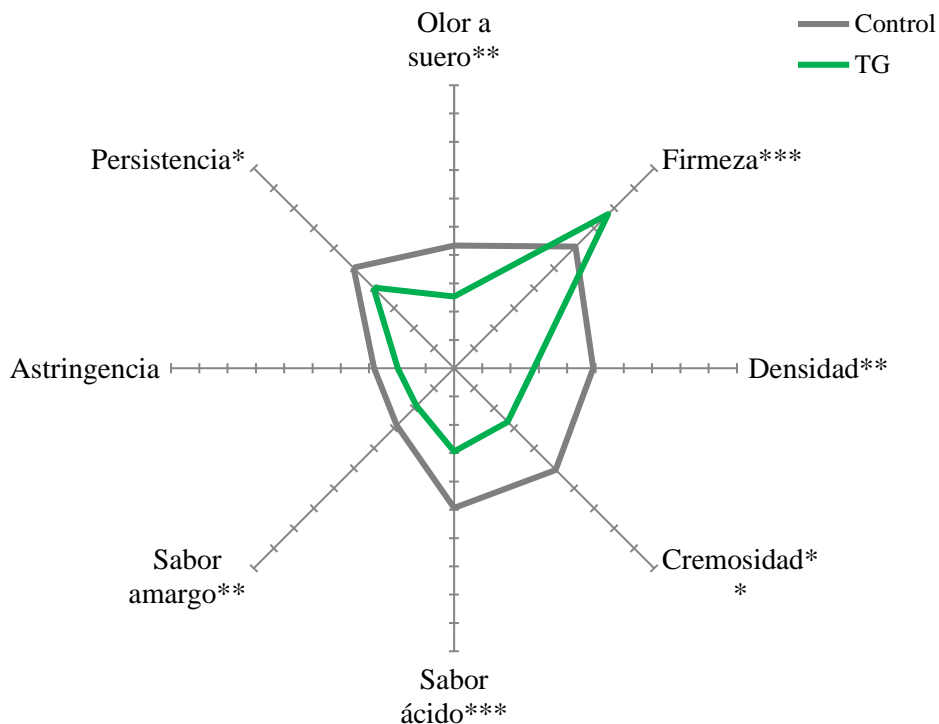


Figura 6.1. Perfil sensorial del yogur tratado con transglutaminasa microbiana (mTG) y del yogur sin mTG (Control). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

El test t de Student para muestras apareadas muestra diferencias estadísticamente significativas para la mayoría de descriptores sensoriales. El olor a suero ( $p=0.0099$ ); la densidad ( $p=0.0069$ ); la cremosidad ( $p=0.0010$ ), el sabor ácido ( $p=0.0001$ ), el sabor amargo ( $p=0.0048$ ) y la persistencia ( $p=0.0191$ ) son significativamente menores en el yogur con mTG que en el Control, mientras que la firmeza ( $p=0.0003$ ) es mayor que en el Control.

Los resultados concuerdan con estudios previos en los que se observa un efecto de la adición de la mTG sobre la textura, aumentando la firmeza y la consistencia y disminuyendo tanto el olor a suero como el suero libre (Sodini *et al.*, 2004; Özer *et al.*, 2007; Şanlı *et al.*, 2011; Domagała *et al.*, 2013).

### 6.3.2 Evaluación con consumidores

Los consumidores evalúan el aspecto, el olor, el sabor, la textura y la aceptación general de las muestras de yogur (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Valoraciones hedónicas (media y desviación estándar) del yogur con mTG y del yogur Control. Media±desviación estándar.

Descriptor	Yogur TG	Yogur Control
Aspecto	6.52±1.27	6.17±1.32
Olor	6.01±1.26	6.36±1.36
Sabor	5.23±1.59	6.10±1.51
Textura	5.31±1.72	6.56±1.51
Aceptación global	5.37±1.56	6.35±1.26

El olor, el sabor, la textura y la aceptación global son significativamente mayores para el yogur Control que para el yogur con mTG ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$  y  $p < 0.0001$ ,

respectivamente). Según Sodini *et al.* (2004), la textura es un descriptor sensorial determinante para la aceptación del yogur.

Los resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas entre la valoración del aspecto del yogur con mTG y el yogur Control.

A los consumidores se les pregunta si consumirían alguno de los yogures que se evalúan, o si descartarían alguno de ellos totalmente para su consumo. El 26.6% de los encuestados afirma que consumiría el yogur con mTG, mientras que el 53.2% de los encuestados afirma que consumiría el yogur Control. Es importante señalar que solo el 28.2% y el 12.1% de los encuestados descartarían totalmente para su consumo el yogur con mTG y el yogur Control, respectivamente.

Las principales razones que motivan el consumo son el sabor, la textura agradables y el beneficio para la salud.

Únicamente el 29.8% de los encuestados prefiere el yogur con mTG frente al 70.2% que eligen el yogur Control. Al aplicar la comparación de proporciones se muestra que esta diferencia es significativa ( $p < 0.0001$ ), por lo que los consumidores prefieren claramente la muestra Control.

Los resultados obtenidos en el test de preferencia y las valoraciones de aceptación global son consistentes, ya que los consumidores prefirieron el yogur Control y la aceptación global del yogur Control es mayor que la del yogur con mTG.

Analizando las puntuaciones de la aceptación global y el porcentaje de consumidores en cada punto de la escala se calcula el índice de aceptación, que resume la distribución de las puntuaciones en la aceptación global (Carbonera *et al.* 2014) (Tabla 6.3). Se observa que el 29.8% de los consumidores posicionan el yogur con mTG en la zona de rechazo de la escala ( $< 5$ ), mientras que solo el 8.9% de los consumidores colocan el yogur Control en esa zona. En la zona de la escala de alta aceptación (8-9), solo el 5.6% de los consumidores colocan en ella el yogur con mTG. El índice de aceptación es del 59.7% para el yogur con mTG y del 70.5% para el yogur Control.

Tabla 6.3 Distribución de las puntuaciones para el yogur con mTG y para el Control y cálculo del índice de aceptación.

Escala	Yogur TG				Yogur Control			
	Nº de Consumidores Puntuando en ese punto de la escala	Puntuación	Media	Índice de aceptación	Nº de Consumidores Puntuando en ese punto de la escala	Puntuación	Media	Índice de aceptación
1	2	2	0.02	0.18	0	0	0.00	0.00
2	3	6	0.05	0.54	1	2	0.02	0.18
3	8	24	0.19	2.15	2	6	0.05	0.54
4	24	96	0.77	8.60	8	32	0.26	2.87
5	26	130	1.05	11.65	16	80	0.65	7.17
6	26	156	1.26	13.98	32	192	1.55	17.20
7	28	196	1.58	17.56	46	322	2.60	28.85
8	7	56	0.45	5.02	18	144	1.16	12.90
9	0	0	0.00	0.00	1	9	0.07	0.81
Total	124	666	5.37	<b>59.68</b>	124	787	6.35	<b>70.52</b>

Los coeficientes de correlación de rangos de Spearman ( $p < 0.01$ ) muestran en el yogur con mTG una alta correlación entre la aceptación global y el sabor ( $r = 0.845$ ) y la textura ( $r = 0.691$ ). En el yogur Control se identifica una correlación ( $p < 0.01$ ) ligeramente menor que en el yogur mTG entre la aceptación global y los mismos descriptores sensoriales ( $r = 0.790$  y  $r = 0.630$ , respectivamente). Los resultados de aceptación y preferencia sitúan al yogur con mTG en una posición inferior al yogur Control.

Debido a la relación observada entre el sabor y la textura con la aceptación global, una modificación de cualquiera de ellos podría ser una alternativa para aumentar la aceptación global. Sin embargo, el análisis de oportunidades demuestra que este no es el caso, debido a que una reformulación del producto, que implique cambios en el sabor y en la textura supondría un riesgo muy alto de disminución de la aceptación global. La razón es que la textura y el sabor son los descriptores sensoriales más valorados para el yogur con mTG por aquellos consumidores que muestran la mayor aceptación de éste yogur (Figura 6.2).

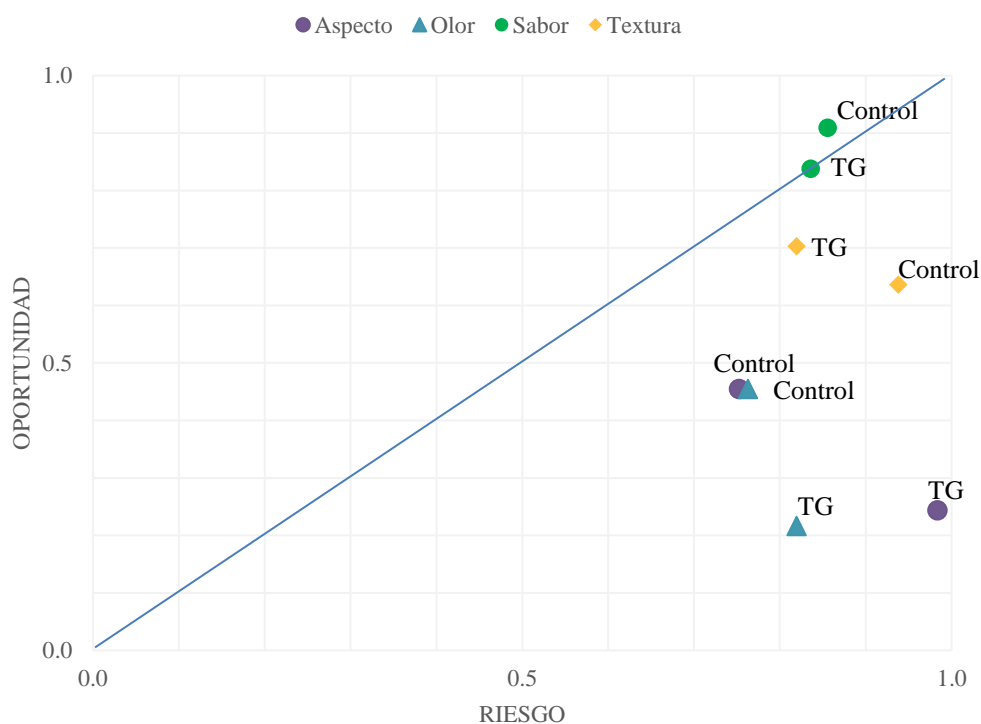


Figura 6.2. Análisis de oportunidades para el yogur tratado con mTG (TG) y del yogur control (C) obtenidos mediante el análisis descriptivo cuantitativo.

### 6.3.3 Relación entre la aceptabilidad, la preferencia y los atributos sensoriales

Varios estudios confirman la importancia de los atributos sensoriales en la aceptación de un alimento (Duboc and Mollet, 2001; Sodini *et al.*, 2004; Janhøj *et al.*, 2006; Jaworska and Hoffmann, 2008; Vargas *et al.*, 2008; Bayarri *et al.*, 2011; Routray and Mishra, 2011). Sin embargo, se identifican grandes diferencias entre el producto ideal para diferentes grupos de consumidores (Bayarri *et al.*, 2011; Masson *et al.*, 2016).

Los resultados del presente estudio indican que, los consumidores muestran una mayor aceptación del yogur Control frente a la observada para el yogur con mTG, lo que sugiere que, en términos de textura, prefieren un yogur cremoso, denso y no demasiado firme. En términos de sabor, les gusta que tenga una ligera acidez, amargor y astringencia, todas ellas características intrínsecas del yogur natural convencional. La importancia de la textura en los productos lácteos es confirmada por varios estudios, específicamente la cremosidad y la firmeza (Barnes *et al.*, 1991; Harper *et al.*, 1991; Duboc and Mollet, 2001; Janhøj *et al.*, 2006; Jaworska and Hoffmann, 2008; Vargas *et al.*, 2008).

También se confirma que el aroma (Routray and Mishra, 2011), la acidez y el amargor son claves para la aceptación general (Barnes *et al.*, 1991; Bayarri *et al.*, 2010). La astringencia afecta la aceptación (Bayarri *et al.*, 2010), aunque en exceso se considera un defecto en el yogur (Lemieux and Simard, 1994).

## 6.4. CONCLUSIONES

- El yogur con mTG es más firme, menos cremoso, menos denso y presenta una menor acidez, amargor y persistencia en boca que el yogur Control.
- Los consumidores puntúan más alto la aceptación global del yogur Control y lo prefieren al yogur con mTG.



- El índice de aceptación es del 59.7% para el yogur con mTG y del 70.5% para el yogur Control.
- La información obtenida en este estudio puede ser importante para predecir o explicar la respuesta del mercado a los yogures con mTG.

## 6.5 AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a BDF Natural Ingredients (Girona, España) por el asesoramiento y el suministro de la transglutaminas microbiana (Probind) y el cultivo láctico (LyoCulture). Se reconoce el apoyo de Jordi Bosch (BDF Natural Ingredients, Girona, España). Esta investigación fue financiada por el MICINN (España) (proyecto RTC2014-1835-2).

## 6.6 BIBLIOGRAFÍA

Barnes, D.L., Harper, S.J., Bodyfelt, F.W. & McDaniel, M.R. (1991). Correlation of Descriptive and Consumer Panel Flavor Ratings for Commercial Prestirred Strawberry and Lemon Yogurts. *Journal of Dairy Science*, 74, 2089-2099.

Bayarri, S., Carbonell, I., Barrios, E.X. & Costell, E. (2010). Acceptability of yogurt and yogurt-like products: Influence of product information and consumer characteristics and preferences. *Journal of Sensory Studies*, 25, 171-189.

Bayarri, S., Carbonell, I., Barrios, E.X. & Costell, E. (2011). Impact of sensory differences on consumer acceptability of yoghurt and yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 21, 111-118.

Buttriss, J. (1997). Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology*, 50, 21-27.

Carbonera, N., Mitterer-Daltoé, M.L., Lohfeldt, M.I., Pastous-Madureira, L.S., Espírito Santo, M.L.P. & Queiroz, M.I. (2014). Acceptance of fermented anchovy (*Engraulis anchoita*). *Acta Alimentaria*, 43, 239-245.

Domagała, J., Wszolek, M., Tamime, A.Y. & Kupiec-Teahan, B. (2013). The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research*, 112, 154-161.

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, 287-299.

Duboc, P. & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.

Elortondo, F.J.P., Ojeda, M., Albisu, M., Salmerón, J., Etayo, I. & Molina, M. (2007). Food quality certification: An approach for the development of accredited sensory evaluation methods. *Food Quality and Preference*, 18, 425-439.

Everett, D.W. & McLeod, R.E. (2005). Interactions of polysaccharide stabilisers with casein aggregates in stirred skim-milk yoghurt. *International Dairy Journal*, 15, 1175-1183.

Farnsworth, J.P., Li, J., Hendricks, G.M. & Guo, M.R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65, 113-121.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. &

- Vázquez, M. (2019). Sensory evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2088-2095.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.
- González-Martínez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J.M. & Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 334-340.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.
- Grygorczyk, A., Lesschaeve, I., Corredig, M. & Duizer, L. (2013). Extraction of consumer texture preferences for yogurt: Comparison of the preferred attribute elicitation method to conventional profiling. *Food Quality and Preference*, 27, 215-222.
- Guzmán-González, M., Morais, F. & Amigo, L. (2000). Influence of skimmed milk concentrate replacement by dry dairy products in a low-fat set-type yoghurt model system. Use of caseinates, co-precipitate and blended dairy powders. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 433-438.
- Harper, S.J., Barnes, D.L., Bodyfelt, F.W. & McDaniel, M.R. (1991). Sensory ratings of commercial plain yoghurts by consumer and descriptive panels. *Journal of Dairy Science*, 74, 2927-2935.
- Ishii, R., Kawaguchi, H., O'Mahony, M. & Rousseau, B. (2007). Relating consumer and trained panels' discriminative sensitivities using vanilla flavored ice cream as a medium. *Food Quality and Preference*, 18, 89-96.
- Janhøj, T., Petersen, C.B., Frøst, M.B.O.M. & Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological characterization of low-fat stirred yogurt. *Journal of Texture Studies*, 37, 276-299.
- Jaros, D., Partschfeld, C., Henle, T. & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113-155.
- Jaworska, D. & Hoffmann, M. (2008). Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of commercial crispy products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1804-1812.
- Jooyandeh, H., Mortazavi, S.A., Farhang, P. & Samavati, V. (2015). Physicochemical properties of set-style yoghurt as effected by microbial transglutaminase and milk solids contents. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 4, 59-67.
- Kavas, G., Uysal, H., Kilic, S., Akbulut, N. & Kesencas, H. (2003). Some properties of yoghurts produced from goat milk and cow-goat milk mixtures by different fortification methods. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6, 1936-1939.
- Lee, W.J. & Lucey, J.A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, 1127-1136.
- Lemieux, L. & Simard, R. (1994). Astringency, a texturai defect in dairy products. *Lait*, 74, 217-240.

- Loveday, S.M., Sarkar, A. & Singh, H. (2013). Innovative yoghurts: Novel processing technologies for improving acid milk gel texture. *Trends in Food Science and Technology*, 33, 5-20.
- Lucey, J.A. & Singh, H. (1997). Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International*, 30, 529-542.
- Majchrzak, D., Lahm, B. & Dürschmid, K. (2010). Conventional and probiotic yogurts differ in sensory properties but not in consumers' preferences. *Journal of Sensory Studies*, 25, 431-446.
- Masson, M., Saint-Eve, A., Delarue, J. & Blumenthal, D. (2016). Identifying the ideal profile of French yogurts for different clusters of consumers. *Journal of Dairy Science*, 99, 3421-3433.
- McKinley, M.C. (2005). The nutrition and health benefits of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 1-12.
- Meilgaard, M.C., Carr, B.T., & Civille, G.V. (2016). *Sensory Evaluation Techniques*. 5<sup>th</sup> edition. Ed. CRC Press. Nueva York. ISBN 978-1-4822-1691-2.
- Motoki, M. & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.
- Muir, D.D., Tamime, A.Y. & Wszolek, M. (1999). Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 52, 129-134.
- Murray, J., Delahunty, C. & Baxter, I. (2001). Descriptive sensory analysis: past, present and future. *Food Research International*, 34, 461-471.
- Onwulata, C.I., Rao, D.R. & Vankineni, P. (1989). Relative efficiency of yogurt, sweet acidophilus milk, hydrolyzed-lactose milk, and a commercial lactase tablet in alleviating lactose maldigestion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 49, 1233-1237.
- Özer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A. & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- Pasephol, T., Small, D.M. & Sherkat, F. (2008). Rheology and texture of set yogurt as affected by inulin addition. *Journal of Texture Studies*, 39, 617-634.
- Pereira, R., Matia-Merino, L., Jones, V. & Singh, H. (2006). Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: A sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, 20, 305-313.
- R Core Team. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*.
- Rothman, L. Perker, M.J. (2009). *Just-About-Right (JAR) Scales: Design, Usage, Benefits and Risks*. Ed. ASTM International. EE.UU. ISBN 978-0-8031-7010-0.
- Routray, W. & Mishra, H.N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 208-220.
- Sahan, N., Yasar, K. & Hayaloglu, A.A. (2008). Physical, chemical and flavour quality of non-fat yogurt as affected by a  $\beta$ -glucan hydrocolloidal composite during storage. *Food Hydrocolloids*, 22, 1291-1297.
- Sandoval-Castilla, O., Lobato-Calleros, C., Aguirre-Mandujano, E. & Vernon-Carter, E.J. (2004). Microstructure and texture of yogurt as influenced by fat replacers. *International Dairy Journal*, 14, 151-159.

- 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.
- Schorsch, C., Carrie, H. & Norton, I.T. (2000). Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: Influence of cross-links in acid-induced gelation. *International Dairy Journal*, 10, 529-539.
- Semeniuc, C.A., Rotar, A., Stan, L., Pop, C.R., Socaci, S., Mireşan, V. & Muste, S. (2016). Characterization of pine bud syrup and its effect on physicochemical and sensory properties of kefir. *CyTA-Journal of Food*, 14, 213-218.
- Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Kritikos, G. & Tourianis, A. (2013). Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 24-30.
- Shi, J., Han, Y.-P. & Zhao, X.-H. (2017a). Quality attributes of set-style skimmed yoghurt affected by the addition of a cross-linked bovine gelatin. *CyTA-Journal of Food*, 15, 320-325.
- Shi, J., Li, D. & Zhao, X.-H. (2017b). Quality attributes of the set-style skimmed yoghurt containing enzymatic cross-linked or thermal polymerized whey protein isolate. *CyTA-Journal of Food*, 15, 34-40.
- Sidel, J.L. & Stone, H. (1993). The role of sensory evaluation in the food industry. *Food Quality and Preference*, 4, 65-73.
- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, C. & Corrieu, G. (2004). The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113-137.
- Ten Kleij, F. & Musters, P.A.D. (2003). Text analysis of open-ended survey responses: A complementary method to preference mapping. *Food Quality and Preference*, 14, 43-52.
- UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de catadores y catadores expertos General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 11132:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía para la supervisión del desempeño de un panel sensorial cuantitativo. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 13299:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía general para establecer un perfil sensorial. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE 87027:2018. (2018). Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para la elaboración de un perfil sensorial mediante diferentes enfoques. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- Vargas, M., Cháfer, M., Albors, A., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2008). Physicochemical and sensory characteristics of yoghurt produced from mixtures of cows' and

goats' milk. *International Dairy Journal*, 18, 1146-1152.

Vázquez-Velázquez, R., Salvador-Figueroa, M., Adriano-Anaya, L., DeGyves-Córdova, G. & Vázquez-Ovando, A. (2018). Use of starter culture of native lactic acid bacteria for producing an artisanal Mexican cheese safe and sensory acceptable. *CyTA-Journal of Food*, 16, 460-468.

Verbeke, W. (2006). Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference*, 17, 126-131.

Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics*, 1, 80-83.

Yazici, F. & Akgun, A. (2004). Effect of some protein based fat replacers on physical, chemical, textural, and sensory properties of strained yoghurt. *Journal of Food Engineering*, 62, 245-254.

Yokoyama, K., Nio, N. & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447-454.

Yüksel, Z. & Erdem, Y.K. (2010). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 86-97.





## 7. YOGUR DESNATADO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA: EVALUACIÓN DE LA ACEPTACIÓN DEL CONSUMIDOR

### Resumen

En este capítulo se incluye el estudio del perfil sensorial, la aceptación y la preferencia del yogur firme desnatado elaborado utilizando la transglutaminasa microbiana (mTG) propia en una planta piloto.

Las condiciones de operación (método de aplicación y dosis) se seleccionan a partir de los resultados obtenidos en los capítulos 4 y 5 y mediante la aplicación del software Design Expert de Stat Ease, se estima la concentración óptima de mTG óptima en base a los parámetros deseados.

Se elaboran yogures en planta piloto, a partir de leche desnatada pasteurizada con una dosis de mTG propia de  $0.76 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  proteína, que se adiciona al mismo tiempo que el cultivo iniciador. De forma paralela, se elabora un yogur Control, adicionándole a la leche desnatada en polvo y el cultivo iniciador.

Una vez elaborados los yogures, se someten a la evaluación por parte de un grupo de 124 consumidores de yogur seleccionados al azar para evaluar la aceptación y la preferencia y por parte de un panel de catadores entrenado ( $n=17$ ) para evaluar las características sensoriales que pueden afectar a la aceptación del consumidor. Tanto los consumidores, como los catadores entrenados son los mismos que evalúan el yogur elaborado con la mTG comercial testada en el capítulo 6.

El yogur sin mTG (Control) presenta una menor firmeza. El yogur con mTG muestra menor olor a suero y menor sabor ácido que el yogur Control y no presenta suero. A pesar de esas diferencias, los consumidores solo perciben pequeñas diferencias en la textura. En términos de aceptación global y preferencia, no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Se concluye que el uso de la mTG evita la adición de proteínas de la leche u otros aditivos para mejorar la textura del yogur, lo que reduce los costes de producción, manteniéndose la aceptación y preferencia por parte de los consumidores.

**Palabras Clave:** Evaluación sensorial; aceptación; preferencia; transglutaminasa; yogur.

---

Este capítulo está publicado en: *García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Oderiz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019). Skim yoghurt with microbial transglutaminase: evaluation of consumer acceptance. CyTA-Journal of Food, 17, 280-287 (Anexo 4).*

## 7.1 INTRODUCCIÓN

La transglutaminasa microbiana (mTG) es una enzima que forma enlaces entre las moléculas de proteínas (reticulaciones intermoleculares e intramoleculares entre grupos  $\gamma$ -carboxilamida de residuos de glutamina y grupos  $\varepsilon$ -amino de residuos de lisina).

La mTG aislada de *Streptomyces mobaraensis* está disponible comercialmente desde hace varios años. La mTG es una herramienta utilizada en la industria alimentaria debido a su capacidad para mejorar las propiedades de las proteínas que afectan y modifican características del alimento como la firmeza, la elasticidad, la viscosidad, la estabilidad al calor y la capacidad de retención de agua. Varios estudios demuestran que la caseína es un sustrato excelente para la mTG (Motoki and Seguro, 1998; Kuraishi *et al.*, 2001; Dube *et al.*, 2007; Routray and Mishra, 2011).

La fermentación de la lactosa produce ácido láctico, que disminuye el pH y desnaturaliza la proteína de la leche para formar un gel por coagulación, dando lugar a la textura y el sabor característico de los yogures. Se producen también subproductos durante este proceso, que son responsables del aroma y del sabor específico del yogur (Tamine and Robinson, 2007).

Los yogures se pueden clasificar en 2 tipos: i) El yogur firme, que se elabora en el envase de venta, y que se caracteriza por que el producto final presenta una estructura en forma de gel y ii) El yogur líquido, donde el gel se rompe por agitación antes de envasarse.

El yogur es un producto popular en todo el mundo que se ha ganado la aceptación generalizada de los consumidores como un alimento saludable (Adolfsson *et al.*, 2004; McKinley, 2005; Fisberg and Machado, 2015; Glanville *et al.*, 2015). En la actualidad, los consumidores buscan continuamente alimentos nuevos y genuinos, mientras intentan mantener hábitos alimenticios saludables (Karagül-Yüceer *et al.*, 1999; Zhi *et al.*, 2017).

Anualmente en Europa, se consumen alrededor de 16 kg de leches fermentadas per cápita ([https://ec.europa.eu/agriculture/milk/origin-labelling/com-2015-205\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/agriculture/milk/origin-labelling/com-2015-205_es.pdf)). El yogur firme es el más consumido, a pesar de la gran variedad de yogures que ofrece el mercado para satisfacer todos los gustos (diferentes texturas, aromas o contenido de grasa) y ocasiones.

Los fabricantes de alimentos para asegurar el éxito de sus productos en el mercado, deben comprender las preferencias y necesidades de los consumidores. Sin embargo, la elección de alimentos por parte de los consumidores es un fenómeno complejo, que se ve afectado por numerosos aspectos (Pohjanheimo and Sandell, 2009; Kresic *et al.*, 2010). Así, la aceptación del yogur depende de muchos factores, siendo el más importante la calidad sensorial (Gardini *et al.*, 1999; Isleten and Karagül-Yuceer, 2006; Ares *et al.*, 2010; Johansen *et al.*, 2010). Las principales características de calidad sensorial del yogur incluyen la textura, el sabor, el aroma y el flavor (Pereira *et al.*, 2003; Sodini *et al.*, 2004; Jaworska and Hoffmann, 2008; Akalin *et al.*, 2012).

La evaluación sensorial analítica con paneles de catadores, permite identificar los atributos sensoriales clave de los alimentos que condicionan las preferencias del consumidor, proporcionando información de gran valor, y que complementa, los resultados obtenidos con los test de consumidores. Las propiedades sensoriales de los alimentos, generalmente se evalúan utilizando métodos descriptivos, como el perfil sensorial (Zhao *et al.*, 2018). Paralelamente, la determinación del grado de aceptación y/o la preferencia de esos alimentos, implica la utilización de consumidores (Dabija *et al.*, 2018). Establecer relaciones entre los datos sensoriales analíticos objetivos y las preferencias del consumidor, es de gran interés, ya que permite reducir la brecha que puede existir entre el desarrollo de un producto y las expectativas del consumidor. En consecuencia, reduce el número de nuevos productos fallidos en el mercado.



Por lo tanto, mejorar en la capacidad de identificación de los atributos vinculados a los gustos del consumidor parece que es una parte necesaria del desarrollo de nuevos yogures (Guinard and Mazzucchelli, 1996; Masson *et al.*, 2016). Para satisfacer la creciente demanda de productos bajos en grasa, los fabricantes deben tener en cuenta que la demanda de los consumidores de yogur desnatado, también incluye que éstos mantengan una calidad sensorial similar a la de los yogures enteros (Sahan *et al.*, 2008).

Es bien conocido, que el contenido graso tiene un impacto en la textura, el aroma y el sabor de los alimentos. Para mejorar la textura y las propiedades físicas de los productos desnatados o bajos en grasa, ésta es reemplazada por proteínas lácteas, gomas u otros texturizantes, pero los cambios en las propiedades sensoriales son difíciles o imposibles de evitar. Por lo tanto, parece que se requiere más investigación en este campo para conseguir mantener las características sensoriales del yogur entero en los yogures desnatados o bajos en grasa (Routray and Mishra, 2011).

La incorporación de leche desnatada en polvo, se usa tradicionalmente para disminuir la sinéresis y mejorar la textura del gel en la producción de yogur (Akalin *et al.*, 2012). Sin embargo, los ingredientes usados convencionalmente para la fortificación de yogures desnatados o bajos en grasa, pueden afectar negativamente la calidad sensorial y, en consecuencia, disminuir la aceptación (Isleten and Karagul-Yuceer, 2006; Matumoto-Pintro *et al.*, 2011; Ünal and Akalin, 2013). Por lo tanto, es necesario encontrar alternativas.

La reticulación enzimática, puede ser un método alternativo a la adición de proteínas o texturizantes en la producción de yogur desnatado. Los problemas habituales, como la baja fuerza del gel y la sinéresis en el yogur desnatado pueden resolverse mediante un tratamiento con mTG (Faergemand *et al.*, 1998; Motoki and Seguro, 1998; Kuraishi *et al.*, 2001). En consecuencia, el tratamiento con mTG, posiblemente, puede ser un método útil para la producción de yogures desnatados, con un bajo contenido en sólidos (SNF), sin utilizar gelificantes ni estabilizantes y con características texturales similares a las del yogur entero (Yüksel and Erdem, 2010).

El tratamiento con mTG en la producción de yogur se puede realizar por 2 métodos: en 2 etapas, es decir, dejando actuar la mTG antes de la etapa de fermentación (Lorenzen *et al.*, 2002) o bien adicionar de forma simultánea la mTG y el cultivo iniciador (Yüksel and Erdem, 2010). La adición simultánea no requiere la etapa adicional para inactivación térmica de la enzima en el proceso productivo, ya que la mTG se inactiva gradualmente por acidificación del medio.

En estudios previos, se analizan las características físico-químicas y sensoriales de los yogures producidos por ambos métodos (García-Gómez *et al.*, 2018, 2019a). Sin embargo, no se encuentran estudios sobre la aceptación y preferencia del yogur con mTG por parte de un panel con consumidores, salvo los realizados por nuestro grupo de investigación. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es comparar el perfil sensorial de un yogur firme desnatado elaborado con una mTG producida en nuestro laboratorio con el de un control. Así mismo, se pretende estudiar la aceptación y la preferencia de ambos yogures.

## **7.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.2.1 Materias primas**

La leche desnatada es analizada antes de su uso, obteniendo la siguiente composición: 0.04% de materia grasa, 3.30% de proteína y 9.35% de materia seca total. La mTG es producida en nuestro laboratorio, siguiendo el proceso descrito en la patente española (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012). La actividad medida antes de su uso es de 757 U·g<sup>-1</sup>.

Tanto para medir la actividad de la mTG antes de su aplicación, como para determinar la actividad residual de la misma en el producto final, se usa un procedimiento colorimétrico utilizando espectrofotometría NanoDrop®, usando N- $\alpha$ -CBZ-gln-gly (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato. La curva de calibración se elabora usando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). Una unidad de transglutaminasa se define como la formación de un 1  $\mu$ mol de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato en 1 min a 37°C (Grossowicz *et al.*, 1950).

### 7.2.2 Elaboración de los yogures

La fabricación de los yogures se realiza en una planta piloto (Aula de Productos Lácteos, USC, Lugo (noroeste de España). La leche desnatada (120 L) se divide en 2 lotes, uno de 60 L para elaborar yogur desnatado obtenido con mTG (yogur TG) y el otro, también de 60 L, para elaborar el yogur desnatado sin enzima (yogur Control).

Para la elaboración del yogur Control, la leche se fortifica con leche desnatada en polvo, para aumentar la materia seca sin aumentar de manera significativa la grasa, añadiéndola antes del tratamiento térmico, tal y como se hace en la fabricación de yogur a nivel industrial. Para ello, se mezcla la leche desnatada con la leche desnatada en polvo hasta alcanzar los siguientes valores: 0.05% de materia grasa, 3.80% de proteína y 10.45% de materia seca total.

Para elaborar el yogur con mTG, se usa una dosis de 0.76 U·g<sup>-1</sup> proteína en la leche. La dosis se calcula después de realizar estudios preliminares (García-Gómez *et al.*, 2018, 2019) y optimizar dicha dosis de mTG mediante el software Design Expert de Stat Ease®.

En ambos casos, la leche se pasteuriza a 95°C durante 5 minutos y se homogeneiza a 200+50 bar. Posteriormente, se enfría a 43°C. El cultivo láctico liofilizado (LyoCulture Dairy, BDF Natural Ingredients, Girona, España) se inocula a razón de 0.2 g·L<sup>-1</sup> de leche y se mezcla con la leche. La adición de la mTG se realiza simultáneamente con el cultivo iniciador. Con la mezcla se llenan los envases de plástico de 125 g y se incuban a 43°C. Cada lote está formado por 358 yogures.

La coagulación de la leche se controla mediante el cambio de pH durante el período de incubación hasta que se alcanza un valor de 4.6. La mTG se inactiva gradualmente con la disminución del pH por lo que no se detecta actividad de la mTG en el producto al finalizar de la fermentación. Finalmente, los yogures se almacenan en una cámara refrigerada a 4°C.

Los consumidores y el panel entrenado evalúan las muestras una vez transcurridos 4 días.

### 7.2.3 Análisis sensorial descriptivo

Las muestras son evaluadas por un panel entrenado y validado formado por 17 catadores con experiencia previa en establecimiento de perfiles sensoriales de yogur (el número de catadores se incrementa respecto a ensayos anteriores debido a dos nuevas incorporaciones, previo entrenamiento y validación).

Las evaluaciones se llevan a cabo en un laboratorio de análisis sensorial (sala de cata). Las muestras se presentan a los catadores de manera aleatoria codificadas con 3 dígitos en envases de plástico de 125 g. Los catadores disponen de agua para enjuagarse la boca entre muestra y muestra. Los descriptores se evalúan utilizando una escala lineal de 10 cm no estructurada con referencias previamente establecidas (García-Gómez *et al.*, 2019). Las definiciones y el procedimiento de evaluación de los atributos sensoriales se muestran en la tabla 7.1 (García-Gómez *et al.*, 2019).

Tabla 7.1. Definición y procedimiento de evaluación de los atributos sensoriales.

Descriptor	Definición	Escala y referencias	
Olor a suero	Olor percibido al sostener el yogur cerca de la nariz causado por el suero presente en el yogur.	0=Suero de yogur diluido en agua (1:4)	10=Suero de yogur
Firmeza	Fuerza requerida para insertar en el yogur una cucharilla.	0=Natillas	10=Flan de vainilla
Densidad	Percepción de compacidad y cuerpo después de introducir la muestra en la boca y comprimirla entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Petit Suisse
Cremosidad	Percepción de consistencia y suavidad al desplazar la muestra entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Mayonesa
Sabor ácido	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de ácido cítrico.	0=0.13 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico	10=0.60 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico
Sabor amargo	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de cafeína.	0=0.03 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína	10=0.1 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína
Astringencia	Efecto de contracción o desecación en la superficie de la boca causado por soluciones acuosas diluidas de ácido tánico.	0=Ausencia	10=0.1 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido tánico
Persistencia	Tiempo de persistencia de la sensación olfativa vía nasal indirecta/gustativa percibida después de que el producto ha sido tragado o expulsado.	0=<20 s	10=>60 s

#### 7.2.4 Análisis con un panel de consumidores

De manera simultánea al análisis descriptivo con el panel entrenado, se realiza una prueba hedónica en Lugo (noroeste de España). Un grupo de 124 consumidores habituales de yogur, son seleccionados al azar e invitados a participar en el estudio. En cuanto al género, el 64.5% son mujeres y el 35.5% son hombres. En cuanto a la edad, el 37.9% tiene una edad comprendida entre 18 y 39 años, el 39.5% tiene entre 40 y 59 años y el 22.6% tiene más de 60 años.

Las 2 muestras se presentan a los consumidores al azar, en envases de plástico de 125 g y codificadas con un código de 3 dígitos, utilizando un diseño de bloques completo y equilibrado.

Se plantean a los participantes cuestiones sobre los hábitos y la frecuencia de compra y consumo y sobre la motivación para el consumo de yogur. En la prueba de aceptación, se pide que evalúen la apariencia, el olor, el sabor, la textura y la aceptación global utilizando una escala hedónica estructurada de 9 puntos: 1-me disgusta muchísimo, 2-me disgusta mucho, 3-me disgusta, 4-me disgusta ligeramente, 5-ni me gusta ni me disgusta, 6-me gusta ligeramente, 7-me gusta, 8-me gusta mucho y 9-me gusta muchísimo (Majchrzak *et al.*, 2010). A los encuestados también se les pregunta sobre la preferencia, si consumirían o si descartarían totalmente algunos de los productos, así como los motivos para elegir o descartar las muestras.

#### 7.2.5. Análisis estadístico

El test t de Student para muestras apareadas se aplica para examinar las diferencias entre las valoraciones del panel entrenado para los yogures con y sin adición de mTG. Previamente, para estudiar si la diferencia de las medias tiene una distribución normal en cada una de las variables cuantitativas, se aplica el test de Shapiro-Wilk. Se considera que presentan una distribución normal cuando el valor p es no significativo ( $p \geq 0.05$ ). Para aquellos descriptores que no cumplen con el supuesto de normalidad, se aplica el test Wilcoxon con la corrección de Bonferroni.

Se aplica test de independencia Chi-cuadrado de Pearson para estudiar si el perfil del consumidor y la frecuencia o el tipo de yogur consumido son independientes.

Las diferencias en la valoración de la aceptación de los atributos hedónicos, de los 2 tipos de yogur, se evalúan mediante el test de Wilcoxon muestras relacionadas. A continuación, se aplica el test de correlación de rangos de Spearman, para estudiar las correlaciones entre la aceptación de los atributos hedónicos y la aceptación global en ambos yogures.

Los encuestados se agrupan mediante un análisis cluster, aplicando como método de agrupamiento el método de Ward, representando en un gráfico biplot los grupos y los atributos hedónicos correlacionados con la aceptación global.

Para finalizar, se realiza un análisis de correspondencia múltiple (MCA) que permite visualizar gráficamente las asociaciones entre los grupos de consumidores, en función de la aceptación, la preferencia y la motivación para el consumo de yogur.

Los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software Statistics 20 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) y el lenguaje R (R Core Team, 2018).

### 7.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 7.3.1 Análisis sensoril descriptivo

El perfil sensorial obtenido, tras la evaluación sensorial por parte del panel de catadores entrenado, para cada tipo de yogur es diferente, tal y como se puede observar en la figura 7.1.

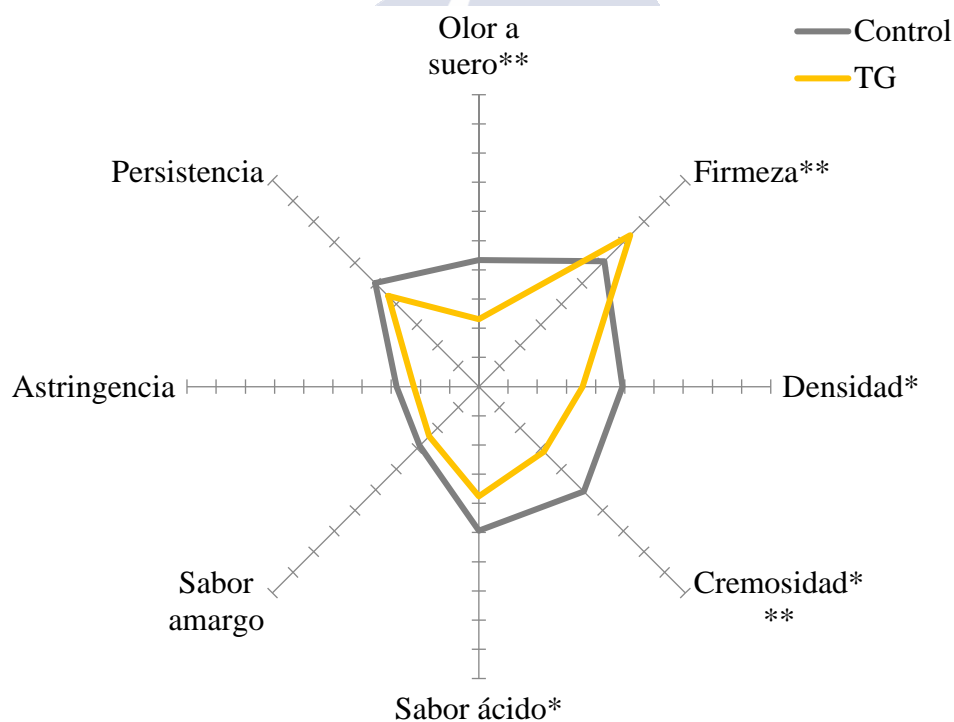


Figura 7.1. Perfil sensorial del yogur elaborado con mTG (TG) y del yogur Control. Significación estadística: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

El panel entrenado detecta una mayor sinéresis en el yogur Control. Además, al aplicar el test t de Student, se observan diferencias significativas en varios atributos sensoriales.

La cremosidad (valor  $p = 0.0005$ ), el olor a suero ( $p = 0.0011$ ), la densidad ( $p = 0.0147$ ) y el sabor ácido ( $p = 0.0138$ ) son percibidos por el panel entrenado con una intensidad más alta en el yogur Control.

Por el contrario, la firmeza ( $p=0.0051$ ) la perciben más baja en el yogur Control. Otros autores también encuentran que el yogur con mTG presenta un sabor ligeramente menos ácido y una firmeza mayor que el yogur Control.

Con respecto a la acidez, otros estudios no encuentran diferencias notables en la acidez de un yogur de leche de camello tratado con mTG y un control sin mTG (Abou-Soliman *et al.*, 2017).

Aunque, contrariamente a nuestros resultados, en otros estudios, el yogur con mTG es ligeramente más cremoso, aunque también presenta un olor a suero menor que el control (Faergemand *et al.*, 1998).

### 7.3.2 Perfil del consumidor

La mayoría de los encuestados comparten la responsabilidad de hacer la compra (64.6%), un 30.6% afirman ser los/-as únicos/-as responsables de la compra de alimentos en el hogar y solo el 4.8% afirma que nunca lo hace. En general, al 93.5% le gusta probar alimentos nuevos.

El consumo de yogur es elevado, ya que el 49.2% de los encuestados consume yogur diariamente y el 25.8% lo hace 3-5 veces por semana. Esto concuerda con otros estudios, en los que el 42.0% de los encuestados consumen yogur una vez al día, el 47.0% lo consumen una vez a la semana y el 11.0% lo consumen yogur una vez al mes (Hekmat and Reid, 2006).

En el presente estudio, según el test de independencia Chi-cuadrado de Pearson la frecuencia de consumo y la edad son independientes ( $p=0.01$ ). Se observa que en los mayores predomina un consumo diario, mientras que en los consumidores más jóvenes el consumo es semanal. Este hecho contrasta con los resultados obtenidos en un estudio anterior, en el que consumo de yogur es mayor para los encuestados más jóvenes (Valli & Traill, 2005).

Los yogures que se consumen con más frecuencia son el yogur firme entero y el yogur firme desnatado. Únicamente el 1.6% de los encuestados son consumidores de yogur líquido. No se encuentra relación significativa entre el tipo de yogur consumido con el género, ni con la edad, excepto en el yogur desnatado con trozos de fruta, que es consumido principalmente por mujeres ( $p=0.024$ ). Esto concuerda con estudios previos donde el bajo contenido graso es un factor importante para las mujeres (Valli and Traill, 2005).

En cuanto a la motivación para el consumo de yogur, la principal razón mencionada es el sabor (80.6%), el 54.8% de los encuestados señala la textura y para el 35,5% la salud es la principal motivación. Otros motivos señalados por los consumidores son el precio, las calorías o que no contengan aditivos (24.2%, 21.8% y 0.8%, respectivamente).

### 7.3.3 Aceptación del consumidor

Hay una proporción importante de encuestados que calificaron ambos yogures con “7-me gusta” (Tabla 7.2). Por lo tanto, en términos de puntuación de los consumidores, los yogures con mTG y Control obtienen puntuaciones similares. El test de Wilcoxon, muestra diferencias estadísticamente significativas en la valoración de la textura entre ambos yogures ( $Z=-3.273$ ,  $p=0.001$ ), en la que los consumidores asignan puntuaciones más altas al yogur Control.

Algunos autores observan que un yogur tratado con mTG obtiene una mejor puntuación que un yogur sin enzima adicionado, en la textura y en el aroma, aunque en ese estudio el yogur control no está fortificado (Aprodu *et al.*, 2011).

Un yogur entero, con una dosis de enzima de  $75 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$  añadida simultáneamente con el cultivo iniciador, obtiene una mejor valoración que un control en la apariencia y en la textura, sin detectarse diferencias en el aroma (Mahmood and Sebo, 2012). En contraposición, se identifica un efecto negativo en la adición de la mTG al yogur en la valoración del aroma y del

olor, probablemente debido al efecto adverso de la adición de la mTG sobre la acidez del yogur y sobre la producción de acetaldehído, principal responsable del aroma (Özer *et al.*, 2007).

Tabla 7.2. Porcentaje de puntuaciones de aceptación obtenidos para el yogur con mTG (TG) y el yogur sin mTG (Control).

		Puntuación de la aceptación (%)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aspecto	TG	0.0	0.8	0.0	5.6	16.2	16.2	43.5	13.7	4.0
	Control	0.8	0.8	2.4	10.5	14.5	20.2	36.3	12.9	1.6
Olor	TG	0.0	0.0	0.0	2.4	25.0	13.7	45.2	10.5	3.2
	Control	0.8	0.0	1.6	3.2	25.1	14.5	35.5	16.9	2.4
Textura	TG	0.0	4.8	4.8	12.1	16.2	19.4	27.4	12.1	3.2
	Control	1.6	0.0	1.6	9.7	4.1	19.4	40.3	18.5	4.8
Sabor	TG	0.0	0.0	8.1	12.9	16.9	20.2	29.8	8.9	3.2
	Control	0.8	0.0	4.8	11.3	13.7	22.6	31.5	12.9	2.4
Aceptación global	TG	0.0	0.0	5.6	8.9	20.2	21.8	29.0	12.1	2.4
	Control	0.0	0.8	1.6	6.5	12.9	25.8	37.1	14.5	0.8

El sabor y la textura son los atributos hedónicos más correlacionados con la aceptación general de ambos yogures. Al realizar el test de correlación de rangos de Spearman, se observa una correlación positiva significativa ( $p < 0.0001$ ) entre las puntuaciones del sabor y de la aceptabilidad global del yogur con mTG y del yogur Control ( $r = 0.874$  y  $r = 0.796$ , respectivamente). También, se observa una correlación positiva entre la textura y la aceptación global ( $r = 0.774$  y  $r = 0.641$ , para el yogur TG y el yogur Control respectivamente).

Varios investigadores concluyen que la textura y los atributos de aroma del yogur son muy valorados por los consumidores y son un factor clave para la discriminación entre los diferentes tipos de yogur (Coggins *et al.*, 2008; Cheng, 2010; Bayarri *et al.*, 2011; Gallina *et al.*, 2012; Bruzzzone *et al.*, 2013).

El sabor, la textura y la aceptabilidad global se incluyen en el análisis cluster por ser los atributos más correlacionados con la aceptación global. Se identifican 3 grupos de consumidores, tal y como se muestra en la figura 7.2.

En la figura 6.3, se muestra la representación de la aceptación para cada grupo. El grupo 1 engloba al 50.8% de los encuestados, que asignan al yogur con mTG puntuaciones altas. El grupo 2 (28.2% de los encuestados) agrupa a aquellos encuestados que muestran una alta aceptación hacia el yogur Control. El grupo 3, que está formado por el 20.9% de los encuestados, está formado por los encuestados con una baja aceptación para ambos yogures. No se observa ninguna relación entre el género, la edad o la disposición para probar nuevos alimentos y la agrupación, ya que el test de independencia Chi-cuadrado de Pearson no es significativo.

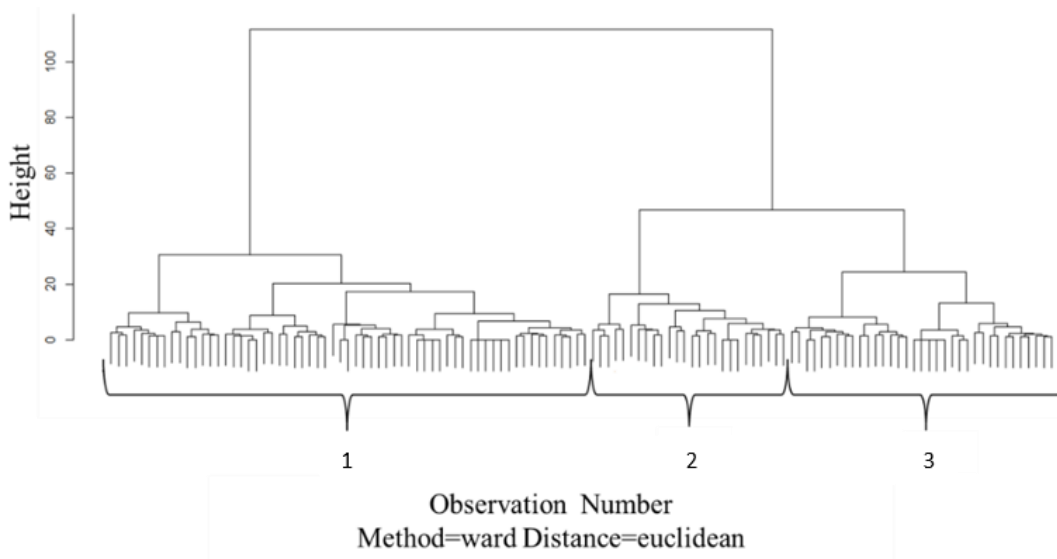


Figura 7.2. Dendograma incluyendo el sabor, la textura y la aceptación global. Cluster 1 = aceptación alta para el yogur con TG; Cluster 2 = aceptación alta para el yogur Control; Cluster 3 = aceptación baja para ambos yogures.

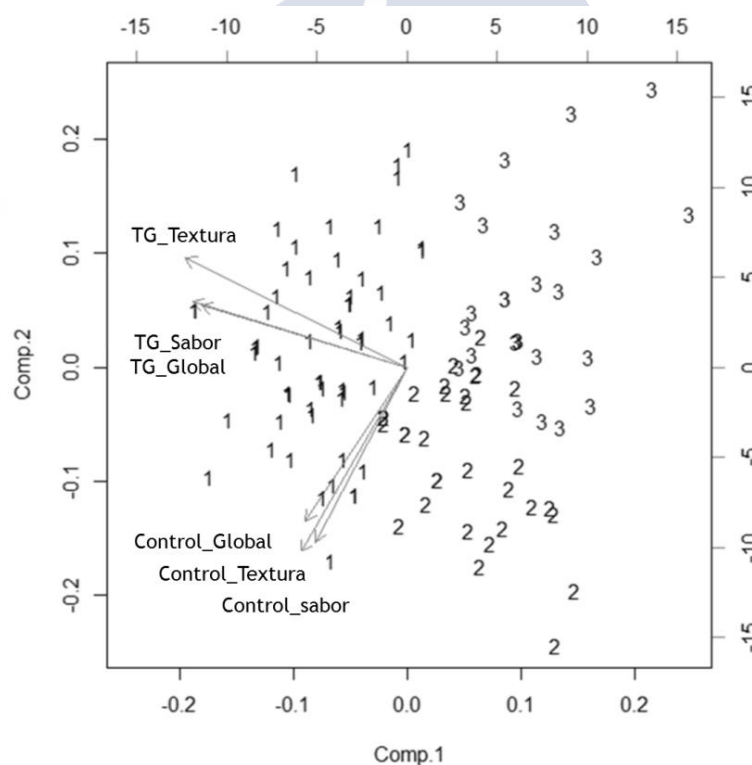


Figura 7.3. Representación biplot de la textura, del sabor y de la aceptación global con los grupos obtenidos del análisis cluster. Cluster 1 = aceptación alta para el yogur con TG; Cluster 2 = aceptación alta para el yogur Control; Cluster 3 = aceptación baja para ambos yogures.

### 7.3.4 Preferencia del consumidor

El principal motivo señalado para preferir, tanto el yogur sin mTG (Control) como el yogur con mTG, es el sabor. Más del 70% de los encuestados consumirían alguno de los 2 yogures propuestos. Las principales razones son: que les gustaba el sabor (80.0%), que les gusta la

textura (33.0%) y por salud (12.0%). La salud es un motivo importante para el consumo de yogur desnatado (Valli and Traill, 2005).

El yogur Control es elegido como preferido por el 55.6% de los encuestados. Sin embargo, el test de comparación de proporciones indica que la diferencia entre los porcentajes de preferencia, respecto al yogur con mTG, no es estadísticamente significativo. Un 86.8% de los consumidores que prefirieren el yogur mTG, lo consumirían debido a su sabor y un 13.2% porque les gusta su textura. Mientras que entre las personas que eligen el yogur Control como preferido, el 75.5% lo consumiría debido al sabor y el 49.0% debido a su textura.

A pesar de la preferencia por uno u otro (mTG o Control), solo el 9.7% y el 12.1% de los consumidores descartan para su consumo el yogur mTG o Control, respectivamente.

La representación gráfica del MCA se realiza con el objetivo de relacionar la aceptación, la preferencia y los motivos de consumo del yogur. Los resultados se muestran en la figura 7.4.

El primer grupo (Cluster 1), engloba a los consumidores con puntuaciones altas en el sabor, la textura y la aceptación global para el yogur con mTG. En consecuencia, son los que prefirieren el yogur adicionado de mTG. En cuanto a los motivos de consumo, se señala la salud, mientras que las propiedades sensoriales (sabor y textura) no se consideran importantes.

El segundo grupo (Cluster 2), está comprendido por aquellos consumidores que muestran una mayor aceptación hacia el yogur Control y, como era de esperar, lo prefirieren sobre el yogur mTG.

El último grupo (Cluster 3), es el que agrupa a los consumidores que muestran una baja aceptación para ambos yogures, no optando por ninguno de los dos y que señalan como motivo de consumo el sabor y la textura.

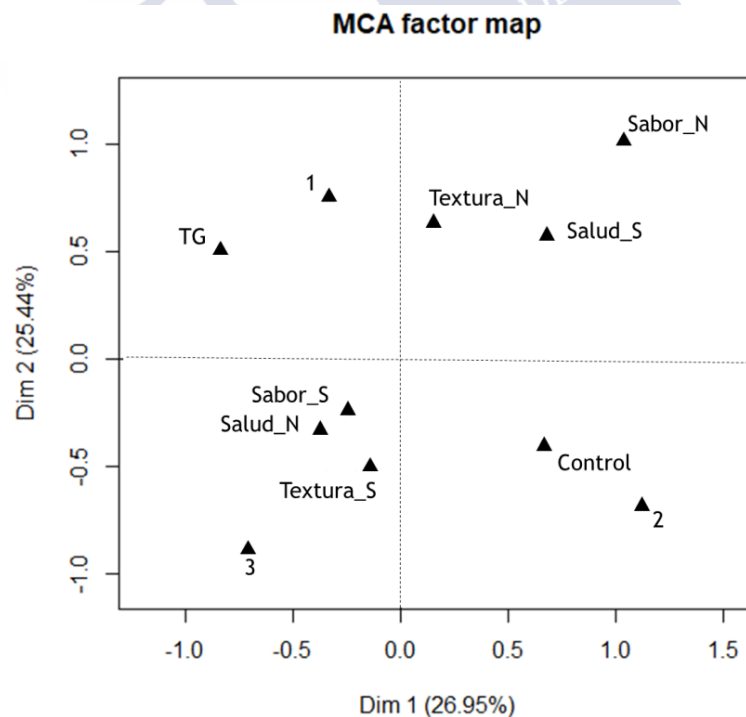


Figura 7.4. Mapa de factores del análisis de correspondencias múltiples (MCA) (1 es el cluster 1, 2 es el cluster 2, 3 es el cluster 3, TG son los consumidores que prefieren el yogur con mTG, Control son los consumidores que prefieren el yogur sin mTG, sabor\_S cuando el sabor es el motivo de consumo, sabor\_N cuando el sabor no es el motivo de consumo, textura\_S cuando la textura es el motivo de consumo, textura\_N cuando la textura no es el motivo de consumo, salud\_S cuando la salud es el motivo de consumo, salud\_N cuando la salud no es el motivo de consumo).



### **7.3.5 Correlación entre las valoraciones del panel entrenado y de los consumidores**

Las diferencias estadísticamente significativas en el sabor ácido detectadas por el panel entrenado son valoradas positivamente por los consumidores, a pesar de que las diferencias en la aceptación del sabor no son estadísticamente significativas.

Las diferencias en el olor a suero son detectadas por el panel entrenado, pero los consumidores no las detectan, ya que el olor de ambos yogures es puntuado de manera muy similar por los consumidores.

Únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de yogur en términos de textura, porque los consumidores dan puntuaciones más altas al yogur Control. Por lo tanto, parece que los consumidores valoran positivamente la densidad y cremosidad más altas y la menor firmeza del yogur Control.

La percepción de cremosidad (consistencia y suavidad) se correlaciona con la aceptación del consumidor en una amplia gama de productos lácteos, incluidos los yogures (Guinard and Mazzucchelli, 1996; Wijk *et al.*, 2006; Janhøj *et al.*, 2006, 2008). Por el contrario, se sugiere que las propiedades de textura sensorial relacionadas con la cremosidad no se correlacionan significativamente con la aceptabilidad de los yogures naturales por parte del consumidor (Jaworska and Hoffmann, 2008).

Para los consumidores estadounidenses, un grado relativamente alto de acidez junto con el aroma intenso del acetaldehído (el compuesto volátil clave del yogur) conducen a una baja aceptación por parte del consumidor (Barnes *et al.*, 1991). Otros estudios concluyen que, en muchos casos, los yogures naturales son, simplemente, demasiado ácidos para muchos consumidores (Harper *et al.*, 1991).

Las características sensoriales del yogur tienen un efecto determinante en la aceptación del consumidor (Pereira *et al.*, 2003; Grygorczyk *et al.*, 2013; Delikanli and Ozcan, 2014), aunque no todas las propiedades sensoriales de textura y los atributos de aroma se correlacionan con la aceptación del yogur (Jaworska and Hoffmann, 2008). La ausencia de suero libre es determinante para la aceptación general de los yogures (Lee and Lucey, 2010).

## **7.4. CONCLUSIONES**

- El yogur mTG es más firme que el yogur Control. Este hecho provoca una disminución de la percepción de cremosidad.
- El yogur mTG muestra un olor a suero y sabor ácido más bajos que el yogur Control.
- A pesar de las diferencias detectadas por el panel entrenado, los consumidores solo perciben diferencias a nivel de la textura. Así, el yogur mTG presenta una aceptación de la textura más baja que el yogur Control.
- No se encuentran diferencias en la aceptación general ni en la preferencia entre los yogures con y sin mTG.
- Por lo tanto, el uso de la mTG evita la adición de proteínas de la leche u otros aditivos para mejorar la textura, disminuyendo el costo de producción con la misma aceptación y preferencia global por parte de los consumidores.

## **7.5 AGRADECIMIENTOS**

Esta investigación está financiada por el MICINN (España) (proyecto RTC2014-1835-2) y Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia (ES) (Proyecto # ED431B 2016/009).

## 7.6 BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Soliman, N.H.I., Sakr, S.S. & Awad, S. (2017). Physico-chemical, microstructural and rheological properties of camel-milk yogurt as enhanced by microbial transglutaminase. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1616-1627.
- Adolfsson, O., Meydani, S.N. & Russell, R.M. (2004). Yogurt and gut function. *The American Journal Clinical Nutrition*, 80, 245-256.
- Akalin, A.S., Unal, G., Dinkci, N. & Hayaloglu, A.A. (2012). Microstructural, textural, and sensory characteristics of probiotic yogurts fortified with sodium calcium caseinate or whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 95, 3617-28.
- Aprodu, I., Gurau, G., Ionescu, A. & Banu, I. (2011). The effect of transglutaminase on the rheological properties of yogurt. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 12, 185-196.
- Ares, G., Giménez, A., Barreiro, C. & Gámbaro, A. (2010). Use of an open-ended question to identify drivers of liking of milk desserts. Comparison with preference mapping techniques. *Food Quality and Preference*, 21, 286-294.
- Barnes, D.L., Harper, S.J., Bodyfelt, F.W. & McDaniel, M.R. (1991). Correlation of Descriptive and Consumer Panel Flavor Ratings for Commercial Prestirred Strawberry and Lemon Yogurts. *Journal of Dairy Science*, 74, 2089-2099.
- Bayarri, S., Carbonell, I., Barrios, E.X. & Costell, E. (2011). Impact of sensory differences on consumer acceptability of yoghurt and yoghurt-like products. *International Dairy Journal*, 21, 111-118.
- Bruzzone, F., Ares, G. & Giménez, A. (2013). Temporal aspects of yoghurt texture perception. *International Dairy Journal*, 29, 124-134.
- Cheng, H. (2010). Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 938-950.
- Coggins, P.C., Schilling, M.W., Kumari, S. & Gerrard, P.D. (2008). Development of a sensory lexicon for conventional milk yogurt in the United States. *Journal of Sensory Studies*, 23, 671-687.
- Dabija, A., Codină, G.G. & Gâțlan, A. (2018). Quality assessment of yogurt enriched with different types of fibers. *CyTA-Journal of Food*, 16, 859-867.
- Delikanli, B. & Ozcan, T. (2014). Effects of various whey proteins on the physicochemical and textural properties of set type nonfat yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 495-503.
- 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, 287-299.
- Faergemand, M., Otte, J. & Qvist, K.B. (1998). Emulsifying properties of milk proteins cross-linked with microbial transglutaminase. *International Dairy Journal*, 8, 715-723.
- Fisberg, M. & Machado, R. (2015). History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition reviews*, 73, 4-7.
- Gallina Toschi, T., Bendini, A., Barbieri, S., Valli, E., Cezanne, M.L., Buchecker, K. & Canavari, M. (2012). Organic and conventional nonflavored yogurts from the Italian market:

Study on sensory profiles and consumer acceptability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2788-2795.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2019). Sensory evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2088-2095.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.

Gardini, F., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E. & Torriani, S. (1999). Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *International Dairy Journal*, 9, 125-134.

Glanville, J.M., Brown, S., Shamir, R., Szajewska, H. & Eales, J.F. (2015). The scale of the evidence base on the health effects of conventional yogurt consumption: Findings of a scoping review. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 1-12.

Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.

Grygorczyk, A., Lesschaeve, I., Corredig, M. & Duizer, L. (2013). Extraction of consumer texture preferences for yogurt: Comparison of the preferred attribute elicitation method to conventional profiling. *Food Quality and Preference*, 27, 215-222.

Guinard, J.X. & Mazzucchelli, R. (1996). The sensory perception of texture and mouthfeel. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 213-219.

Harper, S.J., Barnes, D.L., Bodyfelt, F.W. & McDaniel, M.R. (1991). Sensory ratings of commercial plain yoghurts by consumer and descriptive panels. *Journal of Dairy Science*, 74, 2927-2935.

Hekmat, S. & Reid, G. (2006). Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. *Nutrition Research*, 26, 163-166.

[https://ec.europa.eu/agriculture/milk/origin-labelling/com-2015-205\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/agriculture/milk/origin-labelling/com-2015-205_es.pdf) (consultado 21-11-2019)

Isleten, M. & Karagul-Yuceer, Y. (2006). Effects of Dried Dairy Ingredients on Physical and Sensory Properties of Nonfat Yogurt. *Journal of Dairy Science*, 89, 2865-2872.

Janhøj, T., Bom Frøst, M. & Ipsen, R. (2008). Sensory and rheological characterization of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids*, 22, 798-806.

Janhøj, T., Petersen, C.B., Frøst, M.B.O.M. & Ipsen, R. (2006). Sensory and rheological characterization of low-fat stirred yogurt. *Journal of Texture Studies*, 37, 276-299.

Jaworska, D. & Hoffmann, M. (2008). Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of commercial crispy products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1804-1812.

- Johansen, S.B., Næs, T., Øyaas, J. & Hersleth, M. (2010). Acceptance of calorie-reduced yoghurt: Effects of sensory characteristics and product information. *Food Quality and Preference*, 21, 13-21.
- Karagül-Yüceer, Y., Coggins, P.C., Wilson, J.C. & White, C.H. (1999). Carbonated Yogurt-Sensory Properties and Consumer Acceptance. *Journal of Dairy Science*, 82, 1394-1398.
- Kresic, G., Herceg, Z., Lelas, V. & Jambrak, A.R. (2010). Consumers' behaviour and motives for selection of dairy beverages in Kvarner region: a pilot study. *Mljekarstvo*, 60, 50-58.
- Kuraishi, C., Yamazaki, K. & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17, 221-246.
- Lee, W.J. & Lucey, J.A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23, 1127-1136.
- Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.
- Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2012). Improvement of Yogurt Properties by Microbial Transglutaminase. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 8, 333-342.
- Majchrzak, D., Lahm, B. & Dürschmid, K. (2010). Conventional and probiotic yogurts differ in sensory properties but not in consumers' preferences. *Journal of Sensory Studies*, 25, 431-446.
- Masson, M., Saint-Eve, A., Delarue, J. & Blumenthal, D. (2016). Identifying the ideal profile of French yogurts for different clusters of consumers. *Journal of Dairy Science*, 99, 3421-3433.
- Matumoto-Pintro, P.T., Rabiey, L., Robitaille, G. & Britten, M. (2011). Use of modified whey protein in yoghurt formulations. *International Dairy Journal*, 21, 21-26.
- McKinley, M.C. (2005). The nutrition and health benefits of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 1-12.
- Motoki, M. & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.
- Özer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A. & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- Pereira, R.B., Singh, H., Munro, P.A. & Luckman, M.S. (2003). Sensory and instrumental textural characteristics of acid milk gels. *International Dairy Journal*, 13, 655-667.
- Pohjanheimo, T. & Sandell, M. (2009). Explaining the liking for drinking yoghurt: The role of sensory quality, food choice motives, health concern and product information. *International Dairy Journal*, 19, 459-466.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.
- Routray, W. & Mishra, H.N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 208-220.
- Sahan, N., Yasar, K. & Hayaloglu, A.A. (2008). Physical, chemical and flavour quality of non-fat yogurt as affected by a  $\beta$ -glucan hydrocolloidal composite during storage. *Food Hydrocolloids*, 22, 1291-1297.

- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, S. & Corrieu, G. (2004). The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113-137.
- Tamine, A.Y. & Robinson, R.K. (2007). *Yoghurt : science and technology*. 3<sup>rd</sup> edition. Ed. CRC Press. EE.UU. ISBN 978-1-4200-4453-9.
- Ünal, G. & Akalin, A.S. (2013). Influence of fortification with sodium-calcium caseinate and whey protein concentrate on microbiological, textural and sensory properties of set-type yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 264-272.
- Valli, C. & Traill, W.B. (2005). Culture and food: A model of yoghurt consumption in the EU. *Food Quality and Preference*, 16, 291-304.
- Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).
- Wijk, R.A. de, Terpstra, M.E.J., Janssen, A.M. & Prinz, J.F. (2006). Perceived creaminess of semi-solid foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 412-422.
- Yüksel, Z. & Erdem, Y.K. (2010). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 86-97.
- Zhao, L., Feng, R., Ren, F. & Mao, X. (2018). Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt. *LWT-Food Science and Technology*, 98, 9-17.
- Zhi, N.-N., Zong, K., Thakur, K., Qu, J., Shi, J.-J., Yang, J.-L., Yao, J. & Wei, Z.-J. (2017). Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. *CyTA-Journal of Food*, 16, 1-8.



## 8. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES Y FÍSICO-QUÍMICAS DEL YOGUR DESNATADO OBTENIDO CON TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA

### Resumen

No hay muchos trabajos en los que se estudien los cambios en los yogures elaborados con transglutaminasa microbiana (mTG) durante el almacenamiento.

En este estudio, se evalúan los yogures elaborados con leche desnatada y las 2 mTGs estudiadas en los capítulos 6 y 7 (comercial y propia), aplicadas en una dosis de  $0.76 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ , durante su almacenamiento en refrigeración a lo largo de 35 días, comparando su evolución a lo largo del tiempo con un yogur Control sin mTG.

Los resultados de los parámetros físico-químicos muestran que la firmeza, la consistencia y los valores de pH en el yogur con mTG experimentan un aumento significativo durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, estos cambios no son suficientes para percibir modificaciones significativas desde un punto de vista sensorial durante dicho almacenamiento.

En el yogur Control (sin adición de mTG), únicamente, el sabor ácido aumenta significativamente con el tiempo de almacenamiento.

El tratamiento con mTG aumenta la firmeza y la consistencia y evita completamente la sinéresis de los yogures durante todo el almacenamiento.

El tratamiento con mTG es una alternativa a los tratamientos convencionales con texturizantes y estabilizantes en la producción de yogur desnatado, manteniendo unas buenas propiedades sensoriales durante el tiempo de almacenamiento y que son comparables a las del yogur Control.

**Palabras Clave:** vida útil; yogur; análisis sensorial; textura; almacenamiento.

---

Este capítulo está publicado en: *García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. Effect of storage time on sensory and instrumental properties of skim-milk yoghurt obtained with microbial transglutaminase. International Journal of Dairy Technology. En proceso de impresión (Anexo 5).*

## 8.1 INTRODUCCIÓN

El componente lipídico de los alimentos y en concreto, la grasa de la leche contribuye significativamente a las propiedades de textura y al sabor del yogur (Yildiz-Akgul, 2018) La eliminación parcial o total de la grasa de los yogures, tiene un impacto negativo en la percepción de su calidad, afectando principalmente a la textura, al aroma y a la sinéresis (Sodini *et al.*, 2004; Pereira *et al.*, 2006; Lee and Lucey, 2010; Routray and Mishra, 2011; Rashidi *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2017a,b; Zhi *et al.*, 2018; Malik and Sharma, 2019).

Por lo tanto, mejorar las deficiencias de textura, estructura y de aroma en los yogures desnatados es un reto importante para la industria alimentaria, cuyo objetivo es incrementar la aceptación del consumidor (Zhao *et al.* 2016; Dabija *et al.* 2018).

Existen varios métodos para mejorar la calidad sensorial del yogur desnatado, aunque muchos no cumplen con las expectativas de los consumidores (Duboc and Mollet, 2001).

La adición de transglutaminasa microbiana (mTG) surge como una alternativa para solventar las deficiencias en las características sensoriales de los yogures desnatados (Pakseresht *et al.*, 2017; García-Gómez *et al.*, 2019a,b).

La caseína es un buen sustrato para la mTG (Færgemand and Qvist, 1997), debido a que su estructura abierta permite la formación de un número elevado de enlaces cruzados covalentes (Bönisch *et al.*, 2007a). Varios investigadores estudian los efectos del mTG en los productos lácteos (Özrenk, 2006; Bönisch *et al.*, 2007b; Gauche *et al.*, 2009; Romeih *et al.*, 2014; Gharibzahedi *et al.*, 2018). Nuestro grupo, ha analizado las características físico-químicas y sensoriales de los yogures obtenidos con mTG (García-Gómez *et al.*, 2018, 2019c). Sin embargo, pocos estudios se han centrado en los efectos de la mTG durante el almacenamiento (Ózer *et al.*, 2007; Yüksel and Erdem, 2010; Şanlı *et al.*, 2011; Domagała *et al.*, 2013; Tsevdou *et al.*, 2013) y, únicamente, un estudio proporciona un análisis descriptivo, no hedónico, de yogures tratados con mTG durante el tiempo de almacenamiento (Salvador *et al.*, 2005). La evaluación de los cambios en las características físico-químicas y sensoriales durante el almacenamiento puede permitir predecir la vida útil con una mayor precisión.

Las propiedades de textura, la sinéresis, el aroma y la acidez del yogur son atributos importantes para la aceptación por parte del consumidor (Jaworska *et al.*, 2005; Yüksel and Erdem, 2010).

En el yogur están presentes bacterias vivas, lo que hace que este producto sea particularmente sensible a los cambios durante el almacenamiento. Si el yogur se fabrica en buenas condiciones higiénicas, los cambios bacterianos durante el almacenamiento no representan un peligro para la salud. Sin embargo, las propiedades sensoriales van sufriendo modificaciones hasta que llegan a un punto a partir del cual el consumidor rechaza el producto (Salvador *et al.*, 2005; Zhi *et al.*, 2018).

Los fabricantes tienen información limitada para predecir el ciclo de vida útil con precisión (Coggins *et al.*, 2010), por lo que el estudio de los cambios en las características físicas, químicas y sensoriales durante el almacenamiento prolongado, son cruciales para el establecimiento de la vida útil del producto.

El análisis sensorial descriptivo permite utilizar un lenguaje para definir los atributos, medir las intensidades de esos atributos y profundizar más allá de la presencia o ausencia de defectos específicos (Coggins *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2018).

Los consumidores generalmente juzgan la calidad de los alimentos por sus propiedades sensoriales (Morell *et al.*, 2015). Las propiedades sensoriales evaluadas por un panel entrenado proporcionan información fiable sobre la calidad del producto (Jaworska *et al.*, 2005). En cualquier caso, tanto las evaluaciones instrumentales como las de panel entrenado son importantes.



Como existen pocos estudios que examinen los cambios durante el almacenamiento de yogures elaborado con mTG, se propone evaluar los efectos del tiempo de almacenamiento en las propiedades sensoriales e instrumentales de este yogur, almacenado a 4°C durante 35 días.

## 8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.2.1 Materias primas

Se utiliza leche desnatada (0.04% de grasa, 3.30% de proteína y 9.35% de materia seca total) y 2 mTGs para comparar su efecto sobre las propiedades del yogur.

La primera mTG (TGA) se obtiene en nuestro laboratorio siguiendo el proceso de fabricación descrito en la patente española ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012). La segunda mTG, TGB (Probind®) es suministrada por BDF Natural Ingredients (Girona, España).

En muchos casos, la mTG pierde actividad con el tiempo, por esta razón, la actividad se mide justo antes de su aplicación.

Tanto para medir la actividad de la mTG antes de su aplicación, como para determinar la actividad residual de la misma en el producto final, se usa un procedimiento colorimétrico utilizando espectrofometría NanoDrop®, usando N- $\alpha$ -CBZ-gln-gly (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato. La curva de calibración se elabora usando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). Una unidad de transglutaminasa se define como la formación de un 1  $\mu$ mol de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato en 1 min a 37°C (Grossowicz et al., 1950).

Los resultados obtenidos muestran que la actividad de las mTGs en el momento de su aplicación es de 757 y 66 U·g<sup>-1</sup> para TGA y TGB, respectivamente.

### 8.2.2 Elaboración de los yogures

Los yogures se elaboran en Aula de Productos Lácteos, USC, Lugo (noroeste de España). La leche desnatada (180 L) se divide en 3 lotes de 60 L para elaborar yogures con TGA, con TGB y yogures sin mTG (Control).

La leche para el lote del yogur control se estandariza, para lo cual se mezcla con leche desnatada en polvo para lograr la siguiente composición: 0.05% de grasa; 3.80% de proteína; 10.45% de materia seca total.

La dosis de mTG utilizada para los lotes de TGA y TGB es de 0.76 U·g<sup>-1</sup> de proteína de leche. La dosis se calcula después de realizar estudios preliminares (García-Gómez *et al.*, 2018, 2019c) y optimizar dicha dosis de mTG mediante el software Design Expert de Stat Ease®.

Los lotes se pasteurizan a 95°C durante 5 min y se homogeneizan (200+50 bar). Luego, se enfrían hasta la temperatura de incubación (43°C). El cultivo láctico liofilizado (LyoCulture Dairy, BDF Natural Ingredients, Girona, España) se inocula a razón de 0.2 g·L<sup>-1</sup> de leche y se mezcla con la leche.

En los 2 lotes con mTG, se añade la mTG a la leche al mismo tiempo que el cultivo iniciador. Con la mezcla se llenan los envases de plástico de 125 g y se incuban a 43°C. Cada lote consta de 358 yogures.

La coagulación de la leche se controla mediante el cambio de pH durante el período de incubación, hasta que se alcanza un valor de 4.6. La mTG se inactiva gradualmente con la disminución del pH, no detectándose actividad al final de la fermentación. Los yogures se almacenan en una cámara refrigerada a 4°C hasta su análisis.

Las muestras se analizan en los días 0, 7, 14, 21, 28 y 35. El "Día 0" se considera que es transcurrido 4 días desde la elaboración, para permitir una adecuada estabilización del yogur.

### 8.2.3 Medidas físico-químicas

La textura instrumental del yogur se determina utilizando un analizador de textura (TA.XT plus, Texture Analyzer, Stable Micro Systems, Vienna Court, Reino Unido) dotado de una plataforma de extrusión inversa (modelo A/BE, 40 mm de diámetro interno). El instrumento se ajusta a las siguientes condiciones: diámetro de la sonda cilíndrica: 35 mm; velocidad de penetración:  $60 \text{ mm}^{-1}$ ; distancia de penetración, 80% de su altura inicial. Se analizan 5 muestras de 125 g de cada lote. Se miden 4 parámetros: a) la firmeza (g), que se define como el pico de la fuerza máxima; la consistencia (g·s), que se toma como el área de la curva hasta el punto de firmeza; c) la cohesividad (g), que se define como la fuerza negativa máxima durante el retorno de la sonda y d) el índice de viscosidad (g·s), que se define como el área negativa total obtenida cuando la sonda retorna.

La sinéresis inicial (sinéresis.i) se determina por peso del líquido liberado en la superficie del yogur (Farnsworth *et al.*, 2006) analizando 6 réplicas de cada lote. La sinéresis residual (syneresis.r) se determina en 30 g de yogur sometidos a centrifugación a 222 g y 10°C durante 10 minutos (Tamjidi *et al.*, 2012). El sobrenadante claro se recoge y se pesa, la sinéresis.r se calcula como el líquido liberado. Se analizan 4 réplicas de cada lote.

La actividad del agua (Aw) se mide utilizando un equipo medidor AquaLab (Pullman, EE. UU.). Se analizan 3 réplicas de cada lote. El pH se determina utilizando un medidor de pH portátil (PCE-PH22, PCE Holding GmbH, Meschede, Alemania) y se analizan 3 réplicas de cada lote.

### 8.2.4 Evaluación sensorial

Paralelamente a la realización de las medidas físico-químicas, las muestras son evaluadas sensorialmente por un panel entrenado. El panel de catadores, formado por 15 catadores entrenados, evalúa los yogures a lo largo del tiempo de almacenamiento, en una sala de cata de características estandarizadas, equipada con cabinas individuales (UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014, 2014).

Las muestras se sirven en envases de plástico de 125 g. Cada muestra está codificada con código de 3 dígitos y se presentan siguiendo un diseño experimental de bloques completos al azar. Se proporciona agua para enjuagar la boca entre las muestras.

Se realiza un análisis descriptivo cuantitativo en el que se incluyen descriptores referidos al aspecto, al olor, a la textura en mano y en boca, al sabor, al aroma y a la persistencia. Los 8 descriptores se cuantifican utilizando escalas no estructuradas de 10 cm (Liu, 2018), de manera que los extremos de la escala para la evaluación de cada atributo se corresponden con referencias previamente definidas (UNE-ISO 4121:2006, 2006). Además, se evalúan 3 descriptores con una escala de 2 puntos (presencia/ausencia). Los descriptores seleccionados, las definiciones, técnica de medida y referencias se recogen en la tabla 8.1 (García-Gómez *et al.*, 2019c).

**Tabla 8.1. Definición y procedimiento de evaluación de los atributos sensoriales.**

Descriptor	Definición	Escala y referencias	
Olor a suero	Olor percibido al sostener el yogur cerca de la nariz causado por el suero presente en el yogur.	0=Suero de yogur diluido en agua (1:4)	10=Suero de yogur
Firmeza	Fuerza requerida para insertar en el yogur una cucharilla.	0=Natillas	10=Flan de vainilla
Densidad	Percepción de compacidad y cuerpo después de introducir la muestra en la boca y comprimirla entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Petit Suisse
Cremosidad	Percepción de consistencia y suavidad al desplazar la muestra entre la lengua y el paladar.	0=Cuajada	10=Mayonesa
Sabor ácido	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de ácido cítrico.	0=0.13 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico	10=0.60 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido cítrico
Sabor amargo	Sabor básico similar al producido por soluciones acuosas diluidas de cafeína.	0=0.03 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína	10=0.17 g·L <sup>-1</sup> de disolución de cafeína
Astringencia	Efecto de contracción o desecación en la superficie de la boca causado por soluciones acuosas diluidas de ácido tánico.	0=Ausencia	10=0.1 g·L <sup>-1</sup> de disolución de ácido tánico
Persistencia	Tiempo de persistencia de la sensación olfativa vía nasal indirecta/gustativa percibida después de que el producto ha sido tragado o expulsado.	0=<20 s	10=>60 s
Suero libre (sinéresis)	Observación visual del suero libre en la superficie del yogur.	Presencia	Ausencia
Aromas extraños	Precepción de aromas asociado a defectos (cocinado, ...).	Presencia	Ausencia
Presencia de mohos	Observación visual de mohos en la superficie del yogur.	Presencia	Ausencia

### 8.2.5. Análisis estadístico

Se aplica el test de Dunnett para identificar diferencias significativas comparando cada uno de los días de muestreo durante el almacenamiento (7, 14, 21, 28 y 35 días) con el “Día 0” (Makhoul *et al.*, 2006; Hough and Garitta, 2012).

Además, se realiza un análisis de factores múltiples (Lê and Worch, 2015; Esmerino *et al.*, 2017).

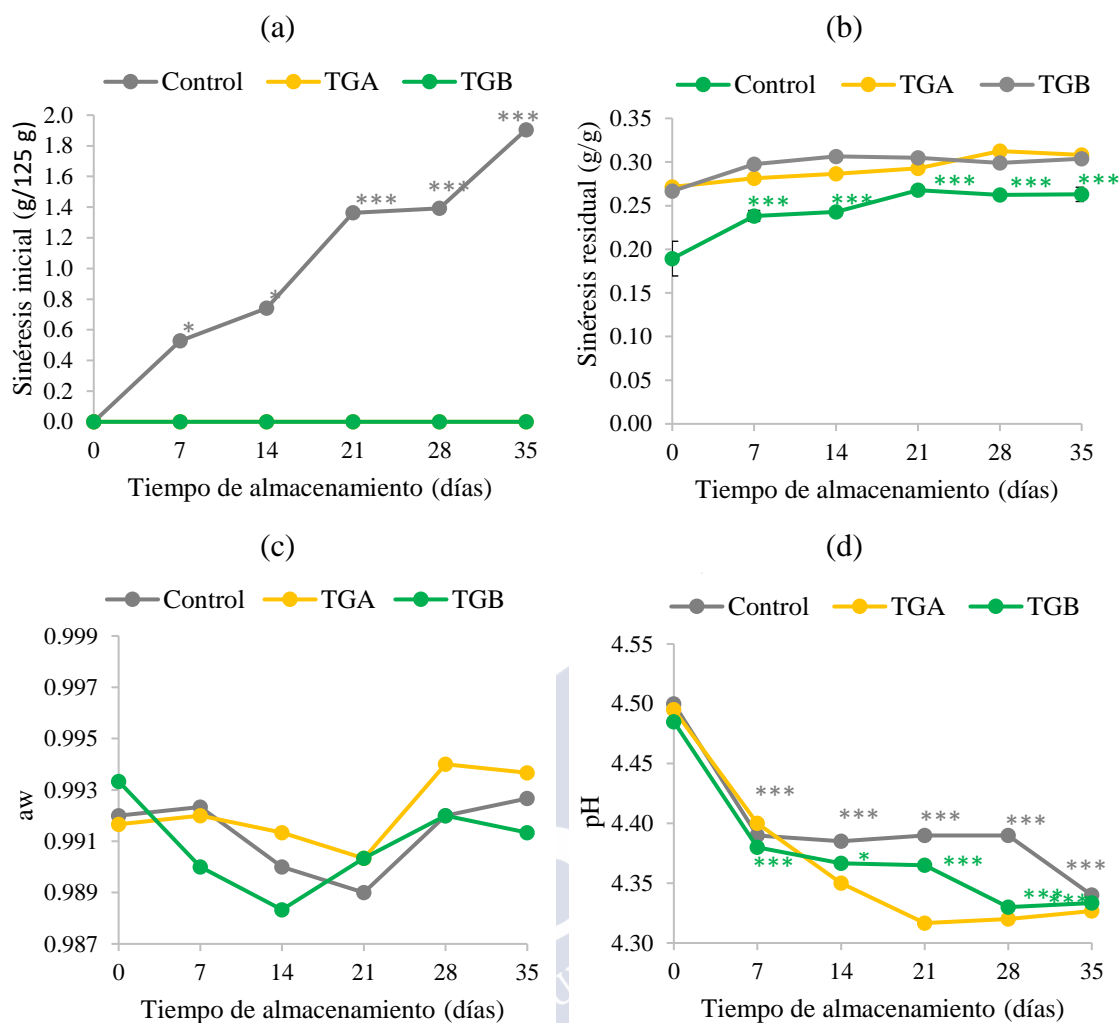
Los análisis estadísticos son realizados utilizando los paquetes SensoMineR (Husson *et al.*, 2017) y FactoMineR (Lê *et al.* 2008) en el lenguaje R, un entorno de software libre para computación estadística y para lenguaje gráfico (R Core Team, 2018).

## 8.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 3 tipos de yogur (TGA, TGB y Control) se analizan durante 35 días para estudiar los cambios en las propiedades físico-químicas y en las características sensoriales durante todo el período de almacenamiento. Además, se evalúa la relación entre los dos tipos de medidas, físico-químicas y sensoriales.

### 8.3.1 Análisis instrumental

La evaluación físico-química incluye medidas de sinéresis inicial, sinéresis residual, actividad del agua y pH. Los resultados se muestran en la figura 8.1.



**Figura 8.1 Sinéresis inicial, sinéresis residual, Aw y pH durante el tiempo de almacenamiento de los yogures Control, TGA y TGB. Los asteriscos indican las diferencias significativas según el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .**

La muestra Control no presenta sinéresis en su superficie en el día 0, pero se va liberando durante el periodo de almacenamiento, hasta alcanzar casi 2 g de suero libre en cada yogur de 125 g (Figura 8.1a). No se observa sinéresis inicial en muestras con mTG (TGA y TGB) durante el período de almacenamiento.

La sinéresis residual (Figura 8.1b) es mayor en las muestras tratadas con mTG en comparación con el Control. No obstante, el aumento de la sinéresis residual en la muestra Control es superior, situándose alrededor del 40%, mientras que en las muestras con mTG no alcanza el 14% en comparación con el tiempo inicial (día 0).

La actividad del agua se sitúa en el rango de 0.987-0.995, siendo similar para los yogures TGA y Control, sin apenas variación durante el almacenamiento (Figura 8.1c).

Los valores iniciales de pH de las muestras tratadas con mTG y Control son muy similares, aun cuando se observan algunas diferencias durante el período de almacenamiento. El pH de la muestra Control es mayor que el pH de las muestras con mTG a partir del muestreo 2 (día 7). Las mayores diferencias se observan en el día 28 de almacenamiento: 4.39 para el control, 4.32 para TGA y 4.33 para TGB (Figura 8.1d).

El test de Dunnett se aplica para estudiar si la evolución en el tiempo de cada una de las características analizadas de cada una de las muestras (Control, TGA y TGB) es significativa.

Tal y como se puede observar en las figuras 8.1.a, 8.1.b, y 8.1.d, existen diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo en la sinéresis inicial, en la sinéresis residual y en el pH de la muestra Control.

La evolución en las características de textura, medidas instrumentalmente (firmeza, cohesividad, consistencia e índice de viscosidad) se muestran en la figura 8.2.

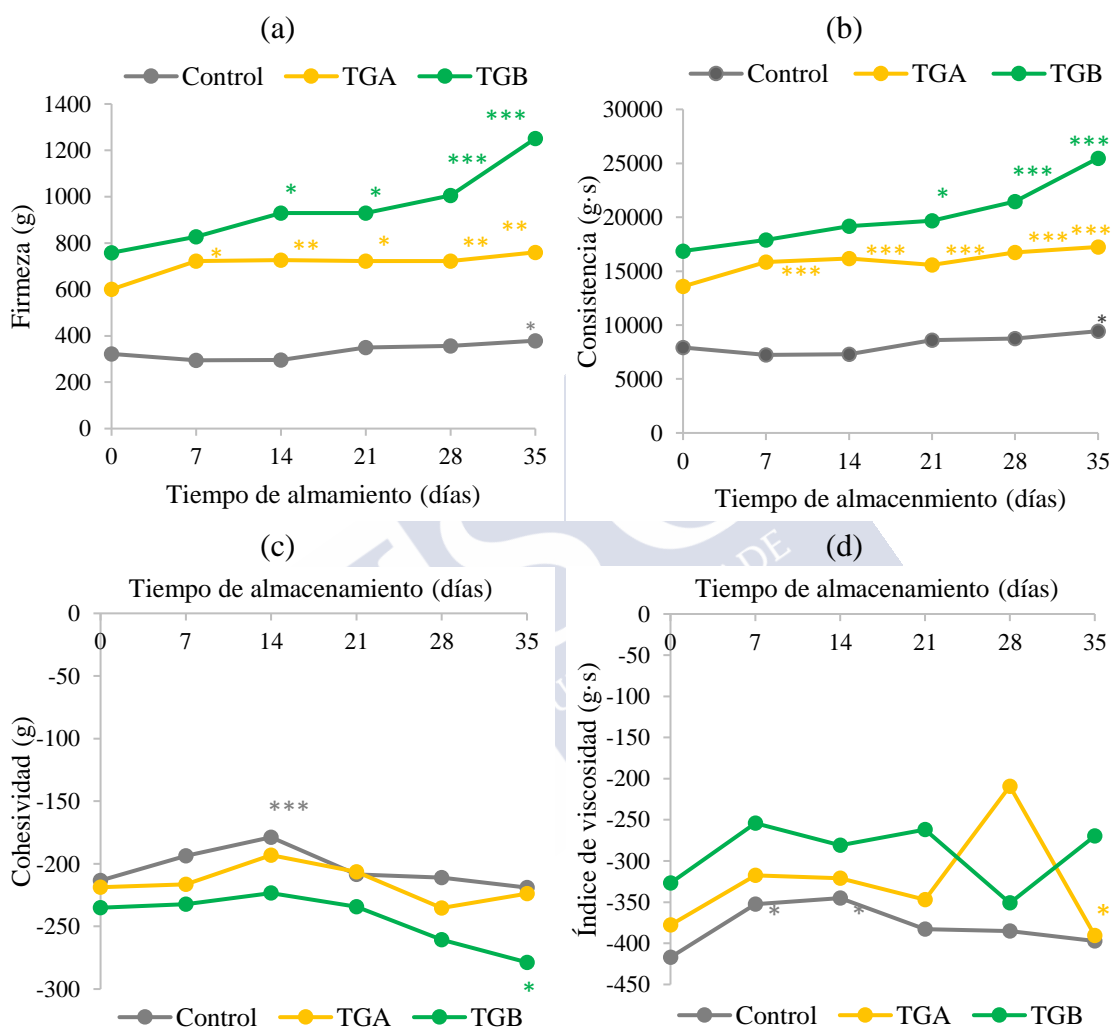


Figura 8.2 Parámetros de textura (firmeza, consistencia, cohesividad e índice de viscosidad) durante el tiempo de almacenamiento de los yogures Control, TGA y TGB. Los asteriscos indican las diferencias significativas según el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Las muestras de yogur con mTG, sufren un aumento importante en la firmeza (más del 25% en TGA y alrededor del 65% en TGB) durante el almacenamiento (Figura 8.2a).

La consistencia aumenta más en los yogures TGB que en TGA, alrededor del 50% y del 27%, respectivamente (Figura 8.2b).

La evolución de la cohesividad es más moderada, observándose un pequeño incremento en los yogures TGB (Figura 8.2c).

Los yogures TGA y los TGB muestran valores más altos en la firmeza, en la consistencia y en la cohesividad que los yogures Control.

Por otro lado, en los yogures TGA y TGB se observan valores más bajos que en el Control en la viscosidad durante el tiempo de almacenamiento (Figura 8.2d). La viscosidad en el yogur TGA muestra un ligero aumento, con respecto al día inicial, mientras que la viscosidad del yogur TGB cae ligeramente (17%).

Tras realizar el test de Dunnett, se pueden observar en la figura 8.2. las diferencias estadísticamente significativas encontradas a lo largo del tiempo de almacenamiento. Estas diferencias se encuentran en la firmeza (figura 8.2a) y en la consistencia (figura 8.2.b) de las muestras tratadas con ambos tipos de mTG (TGA y TGB) durante el período de almacenamiento.

### **8.3.2 Análisis sensorial**

En la figura 8.3. se representan las modificaciones de los valores otorgados por los catadores a los descriptores sensoriales visuales, de olor, de sabor y de aroma durante el tiempo de almacenamiento.

Las diferencias en la valoración del sabor ácido (figura 8.3b) en las muestras tratadas y en la muestra Control son más pronunciadas en el día 0. La muestra Control se sitúa un punto por encima de la muestra TGA y 2 puntos por encima de la TGB. Además, se observa un aumento de la acidez en todas las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento. Los valores más altos para el sabor ácido los presenta el yogur TGB a los 21 y 28 días de almacenamiento.

Las puntuaciones del sabor amargo de la muestra Control son un punto más altas que las puntuaciones obtenidas para las muestras TGA y TGB en el día 0, observándose poca variación durante el periodo de almacenamiento en los 3 tipos de yogur (Figura 8.3c).

Apenas hay diferencias en el descriptor astringencia de las muestras ni al inicio, ni a lo largo del tiempo de almacenamiento (Figura 8.3d).

La persistencia en el día 0 de las muestras TGA y TGB es ligeramente inferior (un punto por debajo) que la de la muestra Control. Apenas se producen cambios a lo largo del tiempo en las 3 muestras estudiadas, tal y como sucede con el sabor amargo (Figura 8.3e).

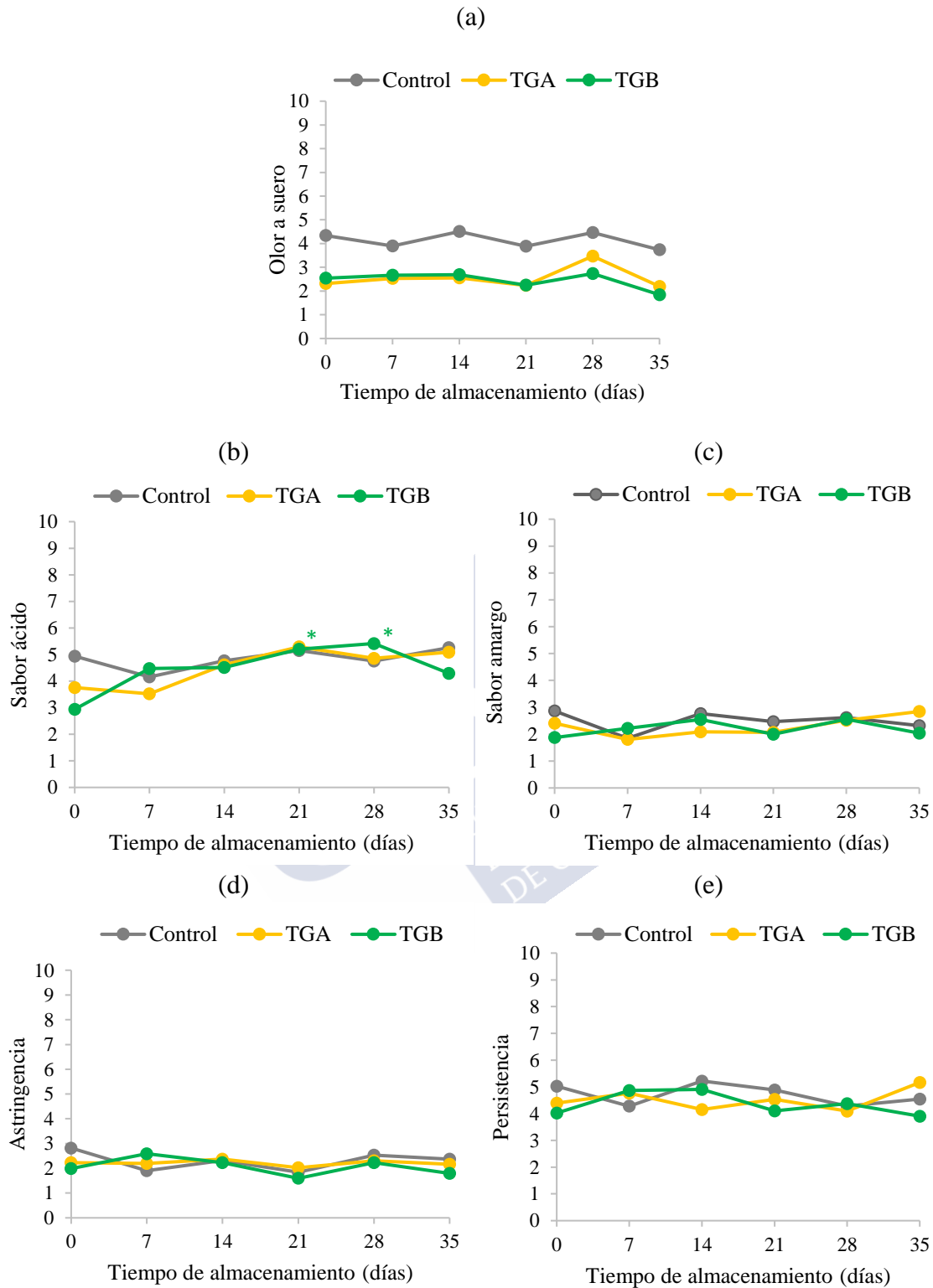


Figura 8.3. Descriptores sensoriales visuales, de olor, de sabor y de aroma durante el tiempo de almacenamiento de los yogures Control, TGA y TGB. Los asteriscos indican las diferencias significativas según el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

En cuanto a la evolución de las puntuaciones dadas por los catadores a los descriptores de textura durante el tiempo de almacenamiento (Figura 8.4), se observa, que el panel entrenado

califica las muestras tratadas con mTG (TGA y TGB) con una mayor firmeza que la muestra Control. Las diferencias en la firmeza entre las muestras tratadas con la enzima y la muestra Control rondan los 2 puntos. No se observan cambios en la firmeza de las muestras con mTG, desde un punto de vista sensorial, durante todo el período de almacenamiento.

Las muestras TGA y TGB muestran una textura menos densa y menos cremosa que la muestra Control (Figura 8.4b,c), a pesar de que no se observan cambios importantes durante el tiempo de almacenamiento. La densidad del yogur TGB se sitúa en 3 y el TGA obtiene puntuaciones ligeramente más altas. Las puntuaciones de la cremosidad son muy similares a las de la densidad.

Finalmente, se analizan los resultados de los 3 descriptores sensoriales cualitativos (Figura 8.5): suero libre, aroma extraños y presencia de moho. No se observa suero libre en las muestras tratadas con mTG a lo largo del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, en la muestra Control, el suero libre está presente en todas las muestras del día 14 (Figura 8.5a). El 8% de los catadores observa la presencia de mohos en la muestra TGB y en la muestra Control el día 21 (Figura 8.5b). Más del 20% de los catadores detectan aromas extraños en el día 28 en las muestras TGA y TGB (Figura 8.5c).

Una vez analizados los datos sensoriales mediante la prueba de Dunnett, se observa que las diferencias encontradas a lo largo del tiempo no son significativas ( $p < 0.05$ ), excepto para el sabor ácido en el yogur TGB (figura 8.3.b).





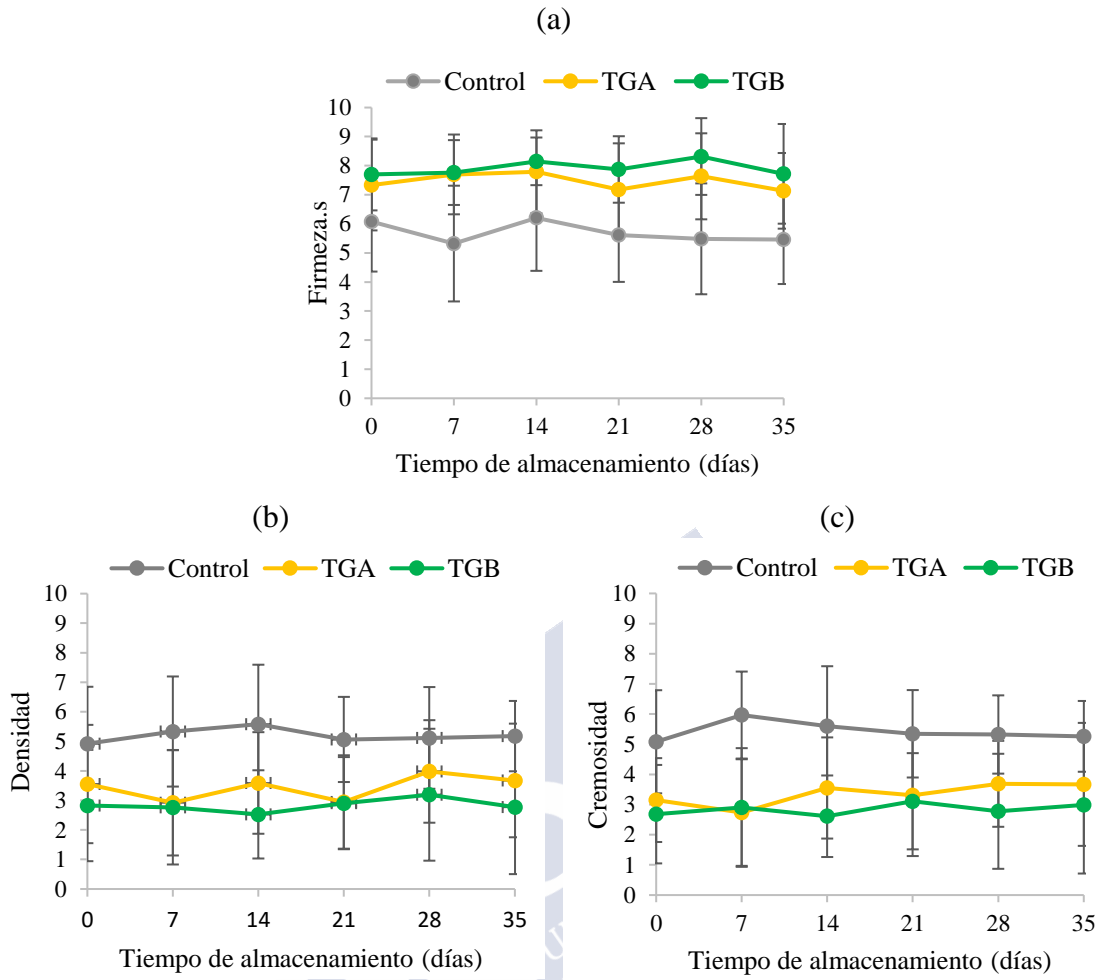


Figura 8.4. Descriptores sensoriales de textura durante el tiempo de almacenamiento de los yogures Control, TGA y TGB. Los asteriscos indican las diferencias significativas según el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

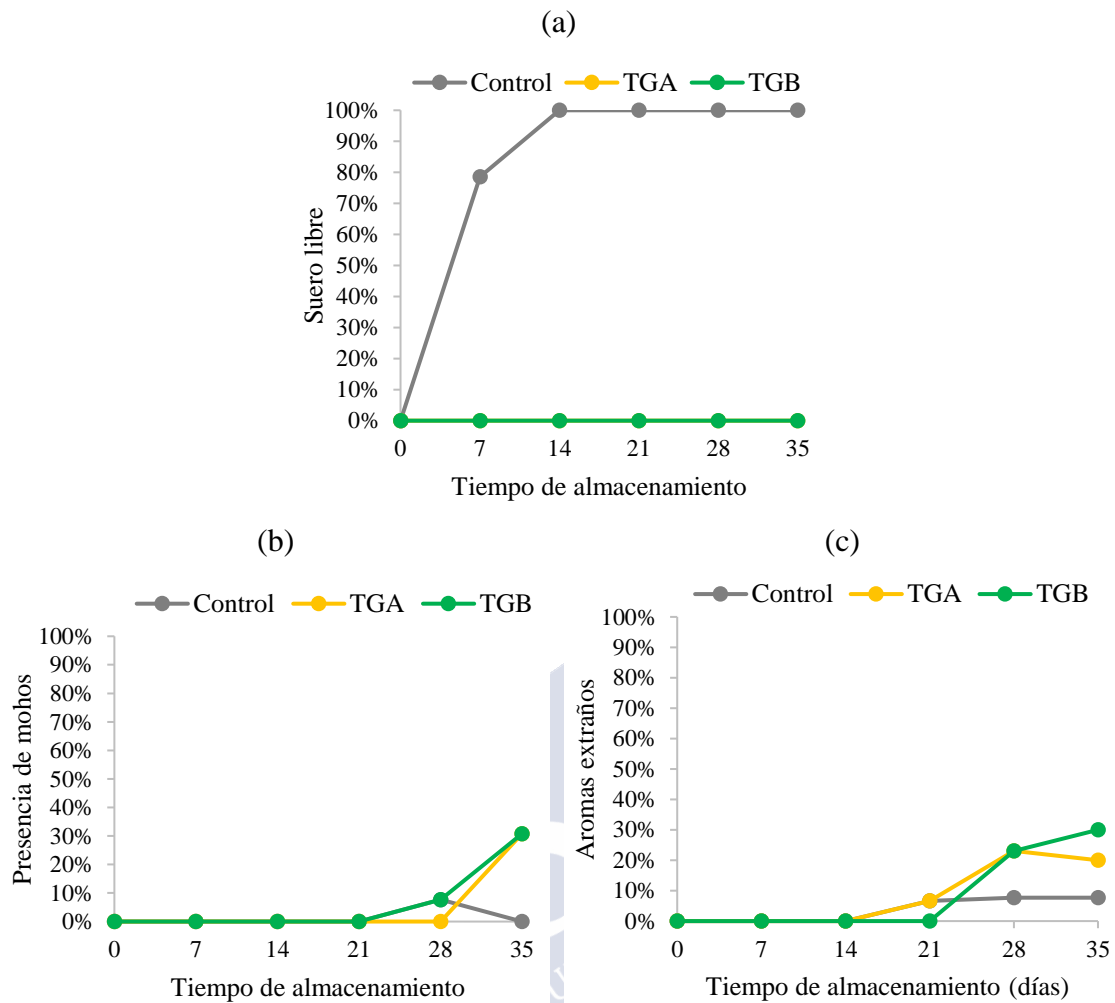


Figura 8.5. Descriptores sensoriales cualitativos durante el tiempo de almacenamiento de los yogures Control, TGA y TGB. Los asteriscos indican las diferencias significativas según el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 8.3.3 Relación entre las medidas instrumentales y sensoriales

Se realiza un MFA para comparar el efecto del tiempo de almacenamiento en los parámetros físico-químicos, instrumentales y sensoriales (Figura 8.6).

Los resultados del análisis factorial múltiple muestran que, los 2 primeros factores representan el 63,0% de la variabilidad explicada. Se recomienda analizar algunos coeficientes del MFA para una interpretación adecuada de los resultados (Lê and Worch, 2015). El primer valor propio fue de 1.0, lo que indica una tendencia a que la primera dimensión en los grupos (físico-químico y sensorial) sea homotética. Esto implica que la mayor parte de la variabilidad observada desde el punto de vista sensorial está de acuerdo con las principales diferencias encontradas en las medidas físico-químicas. El coeficiente RV permite evaluar la fuerza de la relación entre las 2 matrices de datos. Un valor de 0.74 indica la existencia de una relación entre la matriz de datos sensoriales y físico-químicos.

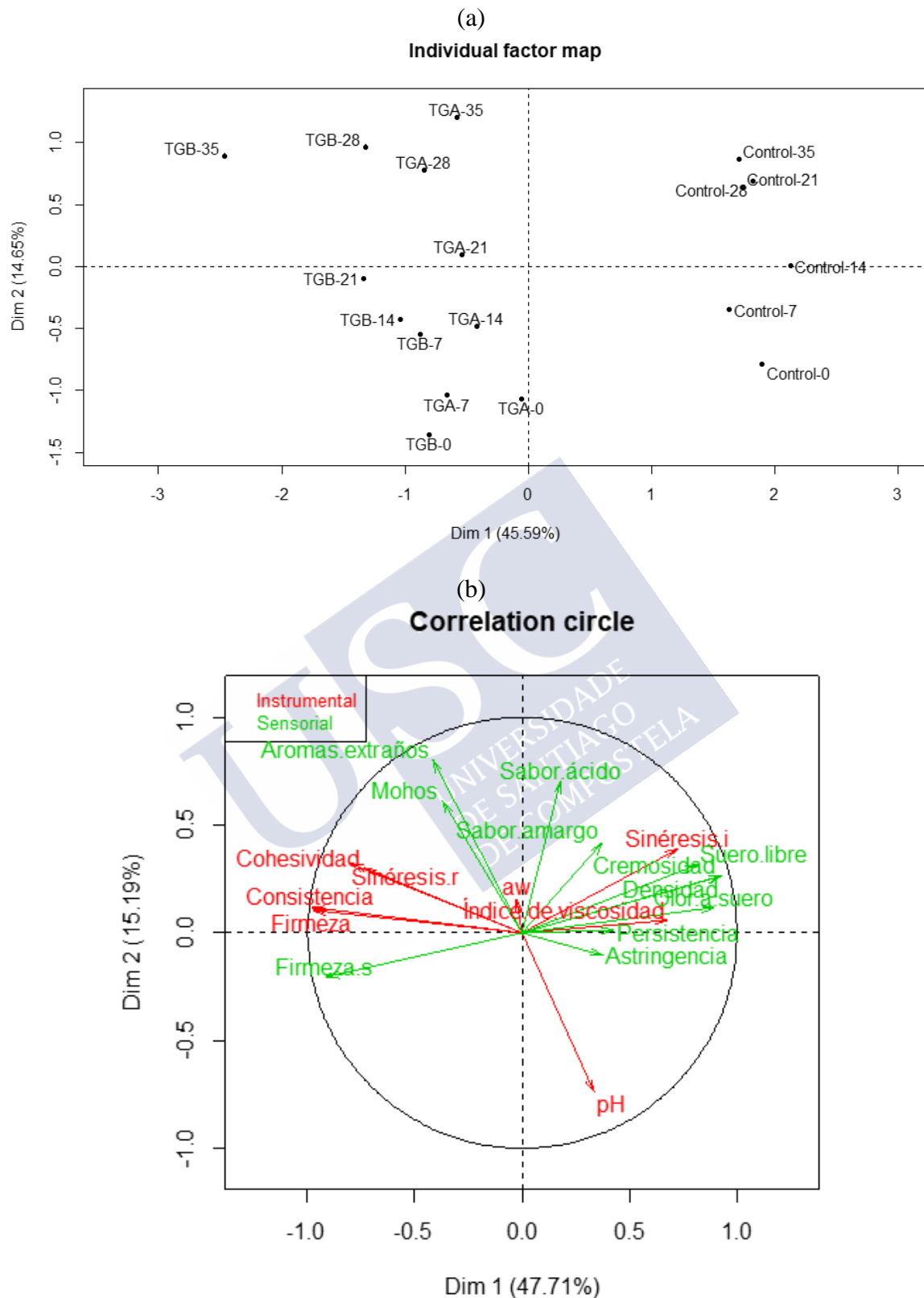


Figura 8.6. Mapa de factores individuales con componentes principales bidimensionales para los yogures a lo largo del tiempo de almacenamiento en función de las variables sensoriales y físico-químicas(a) y la representación de las medidas físico-químicas y sensoriales en las 2 primeras dimensiones resultantes de un MFA a través del círculo de correlaciones (b).

Las variables que muestran una correlación más alta para el eje del factor 1 (47.71%) son: la densidad ( $r=0.929$ ,  $p<0.001$ ), la cremosidad ( $r=0.920$ ,  $p<0.001$ ), el olor a suero ( $r=0.895$ ,  $p<0.001$ ), el suero libre ( $r=0.811$ ,  $p<0.001$ ), la sinéresis.i ( $r=0.720$ ,  $p<0.001$ ) y el índice de viscosidad ( $r=-0.677$ ,  $p<0.01$ ) en el lado positivo; la consistencia ( $r=-0.982$ ,  $p<0.001$ ), la firmeza ( $r=-0.975$ ,  $p<0.001$ ), la firmeza.s ( $r=-0.914$ ,  $p<0.001$ ), la sinéresis ( $r=-0.803$ ,  $p<0.001$ ) y la cohesividad ( $r=0.738$ ,  $p<0.001$ ) en el lado negativo del eje. Estas características permiten distinguir entre las muestras TGA, TGB y Control (Figura 8.6a,b).

El análisis de los parámetros físico-químicos de las muestras con mTG muestra una menor viscosidad y sinéresis inicial (Si) que las muestras Control. Sin embargo, la consistencia, la firmeza, la cohesividad y la sinéresis residual (Sr) son más altas que para la muestra sin tratar (Figura 8.6a,b). Otros investigadores obtienen resultados similares, que confirman que la adición de mTG ( $2.2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína) permite que la firmeza del gel aumente, con valores cada vez más significativos durante el almacenamiento en refrigeración (Temiz and Carmak, 2018). Sin embargo, en otros estudios donde se usa un contenido de proteína de 3.50%, no se encuentran diferencias en los valores de adhesividad y cohesividad entre las muestras tratadas con mTG y las no tratadas (Tsevdou *et al.*, 2013).

El efecto sobre las propiedades sensoriales de los yogures tratados con enzima, se observa principalmente, en los valores sensoriales de firmeza, que son más altos en las muestras tratadas. La muestra Control es más densa, más cremosa y con menor olor a suero y menor cantidad de suero libre en la superficie del yogur. Esos resultados se confirman por otros investigadores, que concluyen que los atributos sensoriales más afectados son los relacionados con la textura (Wróblewska *et al.*, 2011), observándose que los yogures tratados con mTG son menos ácidos, con menos olor a suero, aunque más firmes y cremosos que los yogures no tratados (Lorenzen *et al.*, 2002).

El eje del factor 2 (15.19%) describe la evolución durante el período de almacenamiento (Figura 8.6a). La mayor correlación se observa con los aromas extraños ( $r=0.799$ ,  $p<0.001$ ), con el sabor ácido ( $r=0.706$ ,  $p<0.01$ ) y con la presencia de moho ( $r=0.610$ ,  $p<0.01$ ) en el lado positivo del eje, mientras en el lado negativo del eje, la correlación más alta es con el pH ( $r=-0.739$ ,  $p<0.001$ ).

Por lo tanto, los aromas extraños, el sabor ácido, la presencia de moho y el pH son los parámetros que más se correlacionan con el fin de la vida útil. La figura 8.6b indica claramente que las muestras son percibidas como más ácidas por los jueces con el paso del tiempo. También se detectan aromas extraños y visualmente se aprecian mohos.

El pH muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ), tanto para las muestras tratadas (TGA y TGB), como para las muestras Control en función de los días de muestreo. Las diferencias de pH entre los yogures con mTG y el yogur Control se hacen más visibles desde el día 14 al 28 del período de almacenamiento, mostrando las muestras con mTG los valores de pH más elevados (Figura 8.3).

Las medidas físico-químicas, indican una disminución en los valores de pH con el tiempo, aunque el tiempo de acidificación durante la fermentación es similar para las muestras con mTG y las muestras Control, por lo tanto, no se observa una influencia significativa del tratamiento con mTG en el tiempo de fermentación. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos en otros estudios previos (Wróblewska *et al.*, 2011). Sin embargo, otros autores indican que son necesarios tiempos de fermentación más largos cuando se aplica el tratamiento con mTG (Lorenzen *et al.*, 2002; Özer *et al.*, 2007), pero estos resultados se atribuyen a las diferencias en las condiciones experimentales utilizadas (Bönisch *et al.*, 2007b).

También se observa una disminución en los valores de pH con una dosis de  $\text{mTG} \geq 1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína, después de un almacenamiento de 14 días (Domagała *et al.*, 2013), lo que está en

la misma línea de otras investigaciones previas donde se observa una disminución de los valores de pH, tanto en muestras tratadas con mTG (añadida simultáneamente con el cultivo), como en muestras sin tratar (Mahmood and Sebo, 2012). En otros estudios, los resultados son diferentes, ya que se observa una acidificación reducida en las muestras tratadas con mTG en comparación con las muestras sin tratar. Esto probablemente está relacionado con la inhibición de la multiplicación de las bacterias lácticas, lo que induce a una desaceleración en el desarrollo de la acidez (Lorenzen *et al.*, 2002; Farnsworth *et al.*, 2006; Özer *et al.*, 2007; Tsevdou *et al.*, 2013). Las diferencias con nuestros resultados podrían deberse a una dosis diferente de mTG.

En algunos estudios, observan niveles más bajos de actividad proteolítica y acidez en las muestras tratadas con mTG cuando ésta es inactivada, en comparación con las muestras Control. La acidificación y la proteólisis excesivas están relacionadas con el desarrollo del sabor ácido y amargo, parámetros que, con frecuencia, afectan a la vida útil. Se sugiere que la mTG podría ser una herramienta útil para evitar estos problemas y obtener yogures con una vida útil más larga (Yüksel and Erdem, 2010).

Las figuras 8.1 (d) 8.3 (b), 8.5 (b) y 8.5 (c) muestran la evolución del sabor ácido, del moho, de los aromas extraños y del pH, respectivamente, durante el período de almacenamiento. No se encuentra una correlación significativa entre los parámetros de textura instrumental y el factor 2 del MFA, que está relacionado con la evolución de los yogures a lo largo del tiempo. Sin embargo, aplicando la prueba de Dunnett de manera individual, a las 3 muestras, se encuentra que hay algunas diferencias significativas con el tiempo (Figura 8.2).

En otros trabajos no se detecta ningún efecto sobre los valores de adhesividad y cohesividad en las muestras con un contenido de proteína de 3.50% y tratadas con mTG (Tsevdou *et al.*, 2013). Aunque, si se observa una mayor firmeza y viscosidad a los 14 días de almacenamiento tanto en el yogur con mTG ( $1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína), como en el yogur control elaborados con leche de cabra, a pesar de que los geles de leche de cabra muestran una firmeza inferior a los geles de leche de vaca, observándose siempre valores más elevados de firmeza y de viscosidad en los yogures con mTG que en los yogures control durante todo el período de almacenamiento (Domagała *et al.*, 2013).

Se obtienen yogures con una viscosidad mayor en yogures con una dosis de mTG de  $1 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína en comparación un control sin enzima. Sin embargo, no se observa un aumento significativo de la viscosidad, durante el período de almacenamiento (Şanlı *et al.*, 2011). Otros estudios muestran un comportamiento diferente, aunque se observan valores más altos de viscosidad en las muestras tratadas cuando se inocula con la mTG simultáneamente con el cultivo iniciador, aunque la viscosidad va disminuyendo durante los 21 días de almacenamiento (Mahmood and Sebo, 2012). Las muestras de yogur con mTG añadida simultáneamente con el cultivo iniciador presentan valores más altos de firmeza, consistencia, cohesión e índice de viscosidad en comparación con la muestra de control sin mTG (Iličić *et al.*, 2014). Aunque, la evolución de la firmeza durante un almacenamiento de 10 días depende de la concentración de mTG en yogures batidos, con diferente contenido graso (Iličić *et al.*, 2013). Otros autores observan una ausencia de cambios reológicos, durante el almacenamiento, cuando la mTG se inactiva, mientras que la firmeza continúa aumentando durante el almacenamiento en aquellas muestras que contenían mTG activa (Yüksel and Erdem, 2010). Este hecho, se confirma en un yogur batido, elaborado con leche de vaca, ya que no se observan cambios a nivel reológico, durante las 6 semanas de almacenamiento refrigerado, debido a la inactivación térmica de la mTG, evitando cambios en la estructura de reticulación durante el almacenamiento (Bönisch *et al.*, 2007).

Aunque el MFA no muestra una correlación significativa de la sinéresis*i* con la vida útil, la prueba de Dunnett, como se indica anteriormente (Figura 8.1a), detecta diferencias

estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) a partir del día 7 de almacenamiento en la muestra Control. No se encuentran diferencias significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento en las muestras con mTG.

Por lo tanto, el efecto positivo de la mTG en la sinéresis es indudable, ya que tanto los yogures TGA como TGB, no presentan suero libre en la superficie (sinéresis.i) durante el tiempo de almacenamiento. La ausencia de sinéresis en los yogures tratados puede deberse a una reducción del tamaño de poro en la red de proteínas (Lorenzen *et al.*, 2002). Se observa un efecto positivo del tratamiento con MTG en varios estudios, aunque la sinéresis no se puede prevenir por completo (Özer *et al.*, 2007; Domagała *et al.*, 2013; Tsevdou *et al.*, 2013).

La sinéresis residual, se comporta de manera similar a la sinéresis inicial. Aunque el MFA con los parámetros físico-químicos y sensoriales no muestra una correlación importante entre la sinéresis.r y el eje del factor 2 (evolución del tiempo de almacenamiento) (Figura 8.6), la prueba de Dunnett detecta cambios estadísticamente significativos durante todo el período de almacenamiento para la muestra Control (Figura 8.1b), aunque no se detectan cambios para las muestras tratadas (TGA y TGB).

Otros autores observan una disminución en los valores de sinéresis.r en geles de cabra con mTG y tratados térmicamente, lo que se atribuye a la ausencia de desnaturalización del suero (Ardelean *et al.*, 2012).

Se considera que los aromas extraños y la presencia de moho son inaceptables, por lo que el fin de la vida útil se establece en el día 21, tanto para las muestras con mTG como para el Control.

#### 8.4. CONCLUSIONES

- El análisis factorial múltiple (MFA), es una herramienta útil para evaluar datos sensoriales e instrumentales en conjunto. Los resultados del análisis, facilitan la identificación de los parámetros relacionados con una pérdida de calidad a lo largo del tiempo de almacenamiento y de las principales variables diferenciadoras entre los yogures elaborados con y sin mTG.
- Se seleccionan la presencia de aromas extraños y moho y el incremento del sabor ácido y del pH, como las principales causas del deterioro del yogur.
- La adición de mTG en la elaboración de yogur previene la sinéresis del yogur durante el período de almacenamiento, además de aumentar la firmeza y la consistencia, lo que mejora las características de textura.
- La transglutaminasa microbiana es, por lo tanto, una alternativa para evitar los costes de la fortificación con leche desnatada en polvo y/o la adición de estabilizantes.

#### 8.5 AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a BDF Natural Ingredients (Girona, España) por su asesoramiento y por suministrar la mTG (Probind®) y el cultivo láctico (LyoCulture®). Agradecen el apoyo de Jordi Bosch (BDF Natural Ingredients, Girona, España). Esta investigación está financiada por MICINN (España) (proyecto RTC2014-1835-2).

#### 8.6 BIBLIOGRAFÍA

Ardelean, A.I., Otto, C., Jaros, D. & Rohm, H. (2012). Transglutaminase treatment to improve physical properties of acid gels from enriched goat milk. *Small Ruminant Research*, 106, 47-53.

- Bönisch, M.P., Huss, M., Lauber, S. & Kulozik, U. (2007). Yoghurt gel formation by means of enzymatic protein cross-linking during microbial fermentation. *Food Hydrocolloids*, 21, 585-595.
- Coggins, P.C., Rowe, D.E., Wilson, J.C. & Kumari, S. (2010). Storage and temperature effects on appearance and textural characteristics of conventional milk yogurt. *Journal of Sensory Studies*, 25, 549-576.
- Dabija, A., Codină, G.G. & Gâțlan, A. (2018). Quality assessment of yogurt enriched with different types of fibers. *CyTA-Journal of Food*, 16, 859-867.
- Domagała, J., Wszolek, M., Tamime, A.Y. & Kupiec-Teahan, B. (2013). The effect of transglutaminase concentration on the texture, syneresis and microstructure of set-type goat's milk yoghurt during the storage period. *Small Ruminant Research*, 112, 154-161.
- Duboc, P. & Mollet, B. (2001). Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11, 759-768.
- Esmerino, E.A., Tavares Filho, E.R., Carr, B.T., Ferraz, J.P., Silva, H.I.A., Pinto, L.P.F., Freitas, M.Q., Cruz, A.G. & Bolini, H.M.A. (2017). Consumer-based product characterization using Pivot Profile, Projective Mapping and Check-all-that-apply (CATA): A comparative case with Greek yogurt sample. *Food Research International*, 99, 375-384.
- Færgemand, M. & Qvist, K.B. (1997). Transglutaminase: effect on rheological properties, microstructure and permeability of set style acid skim milk gel. *Food Hydrocolloids*, 11, 287-292.
- Farnsworth, J.P., Li, J., Hendricks, G.M. & Guo, M.R. (2006). Effects of transglutaminase treatment on functional properties and probiotic culture survivability of goat milk yogurt. *Small Ruminant Research*, 65, 113-121.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2019a). Skim yoghurt with microbial transglutaminase: evaluation of consumer acceptance. *CyTA-Journal of Food*, 17, 280-287.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2019b). Sensory quality and consumer acceptance of skim yoghurt produced with transglutaminase at pilot plant scale. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 388-394.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2019c). Sensory evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2088-2095.
- García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.
- Gauche, C., Tomazi, T., Barreto, P.L.M., Ogliari, P.J. & Bordignon-Luiz, M.T. (2009). Physical properties of yoghurt manufactured with milk whey and transglutaminase. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 239-243.
- Gharibzahedi, S.M., Koubaa, M., Barba, F.J., Greiner, R., George, 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.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.
- Hough, G. & Garitta, L. (2012). Methodology for sensory shelf-life estimation: A review. *Journal of Sensory Studies*, 27, 137-147.
- Husson, F., Le, S. & Cadoret, M. (2017). *SensoMineR: Sensory Data Analysis*. R package version 1.23.
- Iličić, M.D., Milanović, S.D., Carić, M.D., Dokić, L.P. & Kanurić, K.G. (2014). Effect of Transglutaminase on Texture and Flow Properties of Stirred Probiotic Yoghurt during Storage. *Journal of Texture Studies*, 45, 13-19.
- Iličić, M.D., Milanović, S.D., Kanurić, K.G., Vukić, V.R. & Hrnjez, D. V. (2013). The effect of processing parameters on the structure of fermented milk products with transglutaminase addition. *Acta Periodica Technologica*, 321, 67-74.
- Jaworska, D., Waszkiewicz-Robak, B. Kolanowski, W. & Swiderski, F. (2005). Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of natural yoghurts. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 39-46.
- Lê, S., Josse, J. & Husson, F. (2008). *FactoMineR: An R Software, Package for Multivariate Analysis*. *Journal of Statistical*, 25, 1-18.
- Lê, S. & Worch, T. (2015). *Analyzing Sensory Data with R*. Ed. CRC Press. ISBN 978-1-4665-6572-2.
- Lee, W.J. & Lucey, J.A. (2010). Formation and physical properties of yogurt. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*.
- Liu, D. (2018). Effect of Fuzhuan brick-tea addition on the quality and antioxidant activity of skimmed set-type yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 22-33.
- Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.
- Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2012). Improvement of Yogurt Properties by Microbial Transglutaminase. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 8, 333-342.
- Makhoul, H., Ghaddar, T., & Toufeili, I. (2006). Identification of some rancidity measures at the end of the shelf life of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 143-148.
- Malik, M. & Sharma, A. (2019). Optimisation of foam-mat drying of yoghurt and properties of powdered yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 381-387.
- Morell, P., Hernando, I., Llorca, E. & Fiszman, S. (2015). Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: Rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International*, 70, 64-73.



- Özer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A. & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- Özrenk, E. (2006). The use of transglutaminase in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 1-7.
- Pakseresht, S., Mazaheri Tehrani, M. & Razavi, S.M.A. (2017). Optimization of low-fat set-type yoghurt: effect of altered whey protein to casein ratio, fat content and microbial transglutaminase on rheological and sensorial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 54, 2351-2360.
- Pereira, R., Matia-Merino, L., Jones, V. & Singh, H. (2006). Influence of fat on the perceived texture of set acid milk gels: A sensory perspective. *Food Hydrocolloids*, 20, 305-313.
- Pinto, L.P.F., Silva, H.L.A., Kuriya, S.P., Macaira, P.M., Oliveira, F.L.C., Cruz, A.G., Esmerino, E.A.Q. & M, F. (2018). Understanding perceptions and beliefs about different types of fermented milks through the application of projective techniques: a case study using Haire's shopping list and free word association. *Journal of Sensory Studies*, 33, 12326.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.
- Rashidi, A., HadiNezhad, M., Rajabzadeh, N., Yarmand, M.S. & Nemati, S. (2016). Frozen baguette bread dough II. Textural and sensory characteristics of baked product. *Journal of Cereal Science*, 70, 9-15.
- Romeih, E.A., Abdel-Hamid, M. & Awad, A.A. (2014). The addition of buttermilk powder and transglutaminase improves textural and organoleptic properties of fat-free buffalo yogurt. *Dairy Science and Technology*, 94, 297-309.
- Routray, W. & Mishra, H.N. (2011). Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 208-220.
- Salvador, A., Fiszman, S.M., Curia, A. & Hough, G. (2005). S : Sensory and Nutritive Qualities of Food Survival Analysis Applied to Sensory Shelf Life of Yogurts-II : Spanish Formulations. *Journal of Food Science*, 70, 446-449.
- 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.
- Shi, J., Han, Y. & Zhao, X. (2017a). Quality attributes of set-style skimmed yoghurt affected by the addition of a cross-linked bovine gelatin. *CyTA-Journal of Food*, 15, 320-325.
- Shi, J., Li, D. & Zhao, X.-H. (2017b). Quality attributes of the set-style skimmed yoghurt containing enzymatic cross-linked or thermal polymerized whey protein isolate. *CyTA-Journal of Food*, 15, 34-40.
- Sodini, I., Remeuf, F., Haddad, C. & Corrieu, G. (2004). The Relative Effect of Milk Base, Starter, and Process on Yogurt Texture: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 113-137.
- Tamjidi, F., Nasirpour, A. & Shahedi, M. (2012). Physicochemical and sensory properties of yogurt enriched with microencapsulated fish oil. *Food Science and Technology International*, 18, 381-390.

- Temiz, H. & Carmak, E. (2018). The effect of microbial transglutaminase on probiotic fermented milk produced using a mixture of bovine milk and soy drink. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 906-920.
- Tsevdou, M.S., Eleftheriou, E.G. & Taoukis, P.S. (2013). Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk: Effects on the properties and storage stability of set yoghurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 144-152.
- UNE-ISO 4121:2006. (2006). Análisis sensorial. Directrices para la utilización de escalas de respuestas cuantitativas. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).
- Wróblewska, B., Kaliszewska, A., Kołakowski, P., Pawlikowska, K. & Troszyńska, A. (2011). Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 215-227.
- Yildiz-Akgul, F. (2018). Enhancement of torba yoghurt with whey protein isolates. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 898-905.
- Yüksel, Z. & Erdem, Y.K. (2010). The influence of transglutaminase treatment on functional properties of set yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 86-97.
- Zhao, L.L., Wang, X.L., Tian, Q. & Mao, X.Y. (2016). Effect of casein to whey protein ratios on the protein interactions and coagulation properties of low-fat yogurt. *Journal of Dairy Science*, 99, 7768-7775.
- Zhi, N.N., Zong, K., Thakur, K., Qu, J., Shi, J.J., Yang, J.L., Yao, J. & Wei, Z.J. (2018). Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. *CyTA-Journal of Food*, 16, 42-49.



## 9. EFECTO DEL TIPO DE CUAJO Y LA ADICIÓN DE TRANSGLUTAMINASA EN LA PRODUCCIÓN DE QUESO FRESCO: EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS Y TEXTURALES

### Resumen

El queso es un producto con una gran tradición y con un peso económico muy importante en la industria láctea. La mayoría de las variedades de queso se producen por coagulación enzimática de la leche con cuajo, que, en consecuencia, va aportar las enzimas proteolíticas necesarias para formar la cuajada. Además, la proteólisis está relacionada con la liberación de aminoácidos que actúan como precursores de reacciones catabólicas en las que se liberan compuestos aromáticos. Por tanto, la adición de cuajo es un paso crucial en el proceso de elaboración del queso.

De forma tradicional, la coagulación de la leche se hace con quimosina de cuajo obtenida del abomaso de los animales (terneros, cabritos o corderos), aunque también se utilizan sustitutos como son las proteasas microbianas, recombinantes y de origen vegetal.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto del tipo de cuajo en combinación con la incubación previa con transglutaminasa microbiana (mTG) a una dosis  $0.8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína, sobre las propiedades físico-químicas del queso fresco, elaborado con leche de vaca pasteurizada. Los cuajos utilizados en la elaboración de quesos, con y sin adición de mTG, son: cuajo animal, vegetal y microbiano y quimosina recombinante. Cada muestra elaborada con mTG se compara con el correspondiente Control sin mTG.

Se observa que el tipo de cuajo no afecta significativamente ni a la actividad de agua ni al contenido en agua del queso. El tipo de cuajo tiene efecto sobre el rendimiento y sobre los parámetros de textura. Los quesos elaborados con quimosina recombinante presentan mayores rendimientos y los elaborados con cuajo microbiano y vegetal presentan una mayor adhesividad.

Los quesos coagulados con cuajo animal son los más afectados por el tratamiento con mTG, ya que presentan una disminución significativa respecto al Control en la dureza (62.2%), la masticabilidad (75.1%) y la elasticidad (43.7%) y un incremento significativo en la adhesividad y cohesividad.

La adición de mTG combinada con cuajo animal, puede ser una herramienta efectiva para obtener quesos con propiedades de textura diferentes a cuando se emplea cuajo únicamente y un rendimiento ligeramente más alto.

**Palabras Clave:** textura; TPA; rendimiento; queso; cuajo; transglutaminasa.

---

Este capítulo está publicado en: *García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, M. L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, M. Á., & Vázquez, M. (2019). Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh cheese production: Effect on physicochemical and textural properties, LWT-Food Science and Technology, 108279 (Anexo 6)*

## 9.1 INTRODUCCIÓN

El queso, derivado lácteo que se elabora desde hace miles de años, ocupa un lugar destacado en la industria láctea tanto desde el punto de vista del volumen de producción como de la rentabilidad económica (Pinheiro *et al.*, 2012; Fox *et al.*, 2016).

Básicamente, el proceso de elaboración implica la conversión de leche líquida en cuajada sólida, seguida o no de la maduración (Reis and Malcata, 2011). La fabricación tradicional de queso no tiene la capacidad de satisfacer la demanda actual, pero el desarrollo de sistemas de refrigeración, la disponibilidad comercial de los cultivos iniciadores y el uso de leche pasteurizada permitieron un salto cualitativo y cuantitativo en la producción del mismo. La implementación de nuevas tecnologías es una necesidad para optimizar el proceso de producción y satisfacer la demanda del consumidor (Johnson, 2017; Ghanimah *et al.*, 2018).

Además de ser un producto ampliamente consumido, debido a sus propiedades sensoriales, es necesario destacar el importante papel que desempeña en la nutrición humana. Trabajos recientes señalan que el incremento en la concentración de fosolípidos que tiene lugar durante la fermentación de la leche en la fabricación del queso mejora el valor nutricional del queso (Zhi *et al.*, 2017, 2018; Ferreiro and Rodríguez-Otero, 2018). Otros estudios recientes, además, sugieren que algunas bacterias lácticas podrían liberar compuestos bioactivos como lípidos funcionales (CLA), vitaminas, péptidos antimicrobianos, ácido  $\gamma$ -aminobutírico y exopolisacáridos con un efecto potencial en la prevención de algunas enfermedades (Santiago-López *et al.*, 2018).

Se están llevando a cabo muchas investigaciones para mejorar los quesos desde el punto de vista nutricional sin alterar las propiedades sensoriales o la vida útil, tales como reducir el contenido de sodio en más del 30% utilizando sustitutos de la sal (Carmi and Benjamin, 2017).

Hoy en día, los productos lácteos presentes en el mercado se obtienen principalmente de leche de vaca, aunque también son frecuentes los quesos fabricados con leche de pequeños rumiantes como ovejas y cabras (Ardelean *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2012; Llamas-Arriba *et al.*, 2019).

La mayoría de las variedades de queso se producen por coagulación enzimática de la leche con cuajo siendo éste, por tanto, un paso crucial en el proceso de elaboración del queso.

El cuajo, es una mezcla de enzimas proteolíticas y lipolíticas como la quimosina, la pepsina y la lipasa cuya actividad es necesaria para realizar la coagulación la leche. El cuajo es responsable de la degradación de las proteínas de la caseína a través de la ruptura de los enlaces peptídicos covalentes de la  $\kappa$ -caseína formados entre la fenilalanina y la metionina (Selin *et al.*, 2018). La escisión enzimática provoca la desestabilización de las micelas de caseína, que se agregan obteniéndose una red proteica tridimensional, que se denomina cuajada (Fox *et al.*, 2016; Amira *et al.*, 2017). La principal función de la proteólisis es la formación de la cuajada. Además, la proteólisis está relacionada con la liberación de aminoácidos que actúan como precursores de reacciones catabólicas en las que se liberan compuestos aromáticos (Katsiari *et al.*, 2000; Hayaloglu and Karabulut, 2013; Fox *et al.*, 2016).

En la fabricación de queso, la coagulación de la leche se hace tradicionalmente con quimosina de cuajo obtenida del abomaso de los animales (terneros, cabritos o corderos) que es la principal fuente comercial de cuajo animal.

Hay otras enzimas que son capaces de iniciar la proteólisis, como las proteasas aspárticas, que se pueden extraer de algunas plantas, microorganismos y de diferentes rumiantes como el cerdo, el cordero, la cabra y el conejo (Balabanova *et al.*, 2017; Selin *et al.*, 2018). El uso de enzimas sustitutivas del cuajo de ternero también puede ser una alternativa interesante para satisfacer la demanda de las personas lacto-vegetarianas, además tiene la ventaja de contar con la aprobación kosher y halal (Jacob *et al.*, 2011a; Johnson, 2017).

Las propiedades reológicas y sensoriales del queso están relacionadas con la actividad enzimática (Amira *et al.*, 2017). Los sustitutos del cuajo, deben tener una actividad proteolítica relativamente débil para mantener la calidad del producto, ya que una proteólisis excesiva puede causar pérdidas de rendimiento durante la fabricación debido a la desnaturalización de la  $\kappa$ -caseína en el suero y al desarrollo del sabor amargo en el producto final (Mazorra-Manzano *et al.*, 2013; Fox *et al.*, 2016).

Por esta razón, la quimosina, es particularmente adecuada para la fabricación de queso, debido a su baja actividad proteolítica y su alta actividad coagulante de la leche. Los sustitutos más destacables, que cumplen con los requisitos para la fabricación de queso, incluyen enzimas microbianas, recombinantes y de origen vegetal (Shah and Mir, 2014).

Las proteasas vegetales se clasifican en varios grupos de acuerdo con el mecanismo catalítico utilizado durante el proceso hidrolítico. Muchas enzimas utilizadas como coagulantes de la leche contienen proteasas aspárticas. También se utilizan enzimas con acción proteolítica como la cisteína y la serina (Shah and Mir, 2014). Las proteasas aspárticas se extraen principalmente de las flores de diferentes especies de plantas (Amira *et al.*, 2017). El cuajo extraído de las flores secas del cardo silvestre *Cynara cardunculus*, se utiliza desde la antigüedad, en diferentes regiones españolas, en la fabricación de quesos semiduros tradicionales de leche de oveja cruda a nivel artesanal (Sousa and Malcata, 1997; Almeida and Simões, 2018). Su aplicación se ha estudiado también en leche de vaca (Sousa and Malcata, 2002).

Muchas proteasas microbianas extracelulares actúan de manera similar a la quimosina. La ventaja del cuajo microbiano es su disponibilidad, ya que se puede obtener fácilmente por fermentación. Sin embargo, la elevada actividad de estas proteasas durante la elaboración del queso conduce a una degradación excesiva de las proteínas, que se pierden en el suero causando un efecto negativo en el rendimiento quesero (Jacob *et al.*, 2011a). La actividad proteolítica excesiva se controla mediante modificaciones químicas y aplicando herramientas de ingeniería genética sobre el organismo microbiano productor (Yegin and Dekker, 2013).

Hoy en día, las proteasas microbianas se obtienen de *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* y *Cryphonectria parasitica* (Sumantha *et al.*, 2006; Yegin and Dekker, 2013; Balabanova *et al.*, 2017), produciéndose a gran escala para su comercialización y aplicándose en la fabricación de queso (Jacob *et al.*, 2011b). La proteasa aspártica producida por *Rhizomucor miehei* es la más utilizada en la fabricación de queso y está disponible comercialmente a diferentes niveles de termoestabilidad y pureza (Jacob *et al.*, 2011a).

A fines de la década de 1980, usando tecnologías de ADN recombinante se clona el gen de la quimosina, el principal componente coagulante del cuajo. Este gen se incorpora a microorganismos recombinantes o genéticamente modificados que actúan como organismos huéspedes, tales como *Kluveromyces lactis*, *Aspergillus niger* y *E. coli*, obteniéndose la quimosina por fermentación. La principal quimosina recombinante, que contiene quimosina B bovina, se considera hoy la enzima ideal para la coagulación de la leche (Jaros and Rohm, 2017) siendo ampliamente utilizada, algunos datos indican que hoy en día, más del 90% del cuajo utilizado en el queso, es quimosina obtenida por fermentación (Johnson, 2017). Por lo tanto, hoy en día existen 4 fuentes de cuajo en el mercado: cuajo de ternera, quimosina recombinante, cuajo vegetal y cuajo microbiano y, hasta el momento, no existen estudios que comparen el efecto de los 4 cuajos en el mismo tipo de queso.

Por otro lado, la industria alimentaria está buscando desarrollar nuevos productos lácteos con características texturales diferentes (Sharma *et al.*, 2001). En la industria del queso, también es importante mejorar el rendimiento. La reticulación enzimática con transglutaminasa microbiana (mTG) tiene un gran potencial para lograr ambos objetivos (Kuraishi *et al.*, 2001;

Cozzolino *et al.*, 2003; Mahmood and Sebo, 2009; Martins *et al.*, 2014; Gaspar and De Góes-Favoni, 2015; Gharibzahedi *et al.*, 2018).

La mTG puede modificar las proteínas mediante reticulación, por incorporación de grupos amino y por desamidación (Motoki and Seguro, 1998). La reacción de reticulación modifica las propiedades funcionales de las proteínas de origen vegetal y animal, permitiendo obtener productos con mejores propiedades reológicas y sensoriales (Yokoyama *et al.*, 2004; Gauche *et al.*, 2008; García-Gómez *et al.*, 2018, 2019).

A finales de la década de 1980, se aísla una transglutaminasa microbiana de *Streptomyces mobaraensis*, que es  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente y es estable en un amplio rango de pH y temperaturas (Ando *et al.*, 1989). El descubrimiento de la mTG es especialmente útil para la aplicación en la industria alimentaria debido a que las condiciones de operación hacen su implementación más asequible, además de la amplia especificidad de sustrato y a su producción en masa, que disminuyen sus costes (Jaros *et al.*, 2006; Guerra-Rodríguez and Vázquez, 2014).

El objetivo de este estudio es determinar el efecto del tipo de cuajo y de la mTG y de la interacción de ambos, sobre las propiedades físico-químicas del queso fresco elaborado con leche de vaca pasteurizada.

## 9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.2.1 Materias primas

Los quesos se elaboran a partir de leche de vaca comercial entera pasteurizada (3.1% % de proteína, 3.6% de grasa y 3.6% de extracto seco) utilizando 4 tipos de coagulantes: cuajo animal de ternero (actividad coagulante:  $180 \text{ UC} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $95 \pm 5\%$ , quimosina y pepsina  $\leq 5\%$ ), cuajo vegetal de *Cynara cardunculus* (actividad coagulante  $> 120 \text{ UC} \cdot \text{g}^{-1}$ , cuajo microbiano de *Rhizomucor miehei* (actividad coagulante:  $200 \text{ UC} \cdot \text{g}^{-1}$ ) y quimosina recombinante de *Kluyveromyces lactis* (actividad coagulante:  $180 \text{ UC} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Todos los coagulantes son suministrados por Abiasa (Tui, Pontevedra, España).

La mTG es producida en nuestro laboratorio, siguiendo el proceso de fabricación descrito en la patente española ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012).

Tanto para medir la actividad de la mTG antes de su aplicación, como para determinar la actividad residual de la misma en el producto final, se usa un procedimiento colorimétrico utilizando espectrofotetría NanoDrop®, usando N- $\alpha$ -CBZ-gln-gly (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.) como sustrato. La curva de calibración se elabora usando ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato (Sigma-Aldrich Corp, St. Louis, MO, EE.UU.). Una unidad de transglutaminasa se define como la formación de un  $1 \mu\text{mol}$  de ácido L-glutámico  $\gamma$ -monohidroxamato en 1 min a  $37^\circ\text{C}$  (Grossowicz *et al.*, 1950).

La actividad medida de la mTG previamente a su uso es de  $470 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ .

### 9.2.2 Elaboración del queso

El diagrama de flujo de la fabricación de queso y los análisis realizados se muestran en la figura 9.1.

La leche utilizada para hacer los lotes sin mTG (lote 1, 3, 5 y 7), se calienta hasta  $38^\circ\text{C}$ . A continuación, a la leche a  $38^\circ\text{C}$  se le añaden  $0.25 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  de coagulante,  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  (43.5%) y  $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  de NaCl para obtener la cuajada.

La leche que se usa para elaborar las muestras tratadas con mTG (lotes 2, 4, 6 y 8), se calienta hasta  $40^\circ\text{C}$ , a continuación, se añade mTG ( $0.8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína) y la mezcla se incuba durante 20 minutos, a  $38^\circ\text{C}$  antes de añadir el cuajo, para que se forme la cuajada.

El primer lote se coagula con cuajo animal (A); el segundo lote se coagula con cuajo animal y mTG (A+TG); el tercer lote se coagula con quimosina recombinante (Q); el cuarto lote se coagula con quimosina recombinante y mTG (Q+TG), el quinto lote se coagula con cuajo vegetal (V); el sexto lote se coagula con cuajo vegetal y mTG (V+TG); el séptimo lote se coagula con cuajo microbiano (M); y el octavo lote se coagula con cuajo microbiano y mTG (M+TG).

La cuajada obtenida durante la coagulación enzimática se corta en cubos, con un tamaño de 2 cm. La cuajada se separa del suero y se deposita sin ejercer presión, en moldes cilíndricos perforados de 12 cm de diámetro y 7 cm de altura. La cuajada se deja desuerando durante 12 h. Finalmente, los quesos se desmoldan y se almacenan a 4°C durante al menos 24 h antes de analizarlos. Todos los lotes se realizan por duplicado.

Se toman muestras de quesos para el análisis instrumental de textura, el análisis físico-químico y el cálculo del rendimiento.

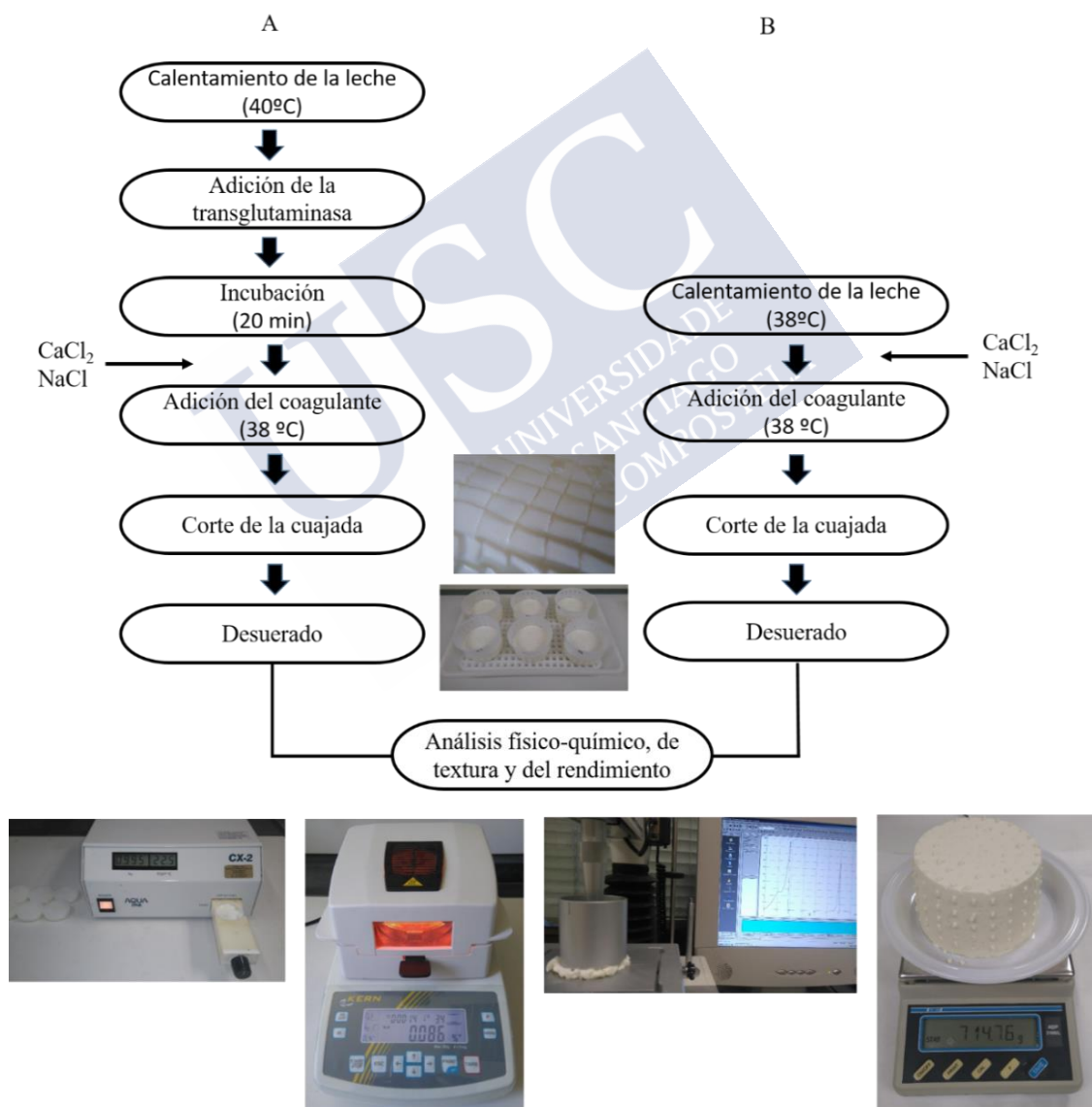


Figura 9.1. Diagrama de flujo para la producción de queso tratado con mTG (A) y sin mTG (B).



### 9.2.3 Medidas físico-químicas

El contenido de agua (W) se determina gravimétricamente, secando la muestra a 102°C durante 48 h. La actividad de agua (Aw) se mide utilizando un medidor AquaLab (Pullman, WA, EE. UU.). W y Aw se determinan en el producto final por triplicado. El rendimiento (Y) de cada lote se expresa en porcentaje, como el peso de queso obtenido por 100 g de leche empleada para la producción de queso.

El queso fresco se corta en cubos pequeños (2 x 2 x 1.5 cm) y se deja a temperatura ambiente para realizar el perfil de textura. Se utiliza un texturómetro TA-XTplus (Stable Micro System, Viena Court, UK), con una sonda cilíndrica de aluminio (P/50) con un diámetro de 50 mm. La velocidad de compresión es de 60 mm·min<sup>-1</sup>. Las muestras se extrusionan al 60% de la altura original y se mide la dureza, la adhesividad, la elasticidad, la cohesividad y la masticabilidad. La dureza se mide como la fuerza a la máxima altura en la primera compresión. La adhesividad se mide como el área bajo el eje x en la curva del gráfico de compresión. La elasticidad se calcula como la altura del producto en la segunda compresión dividida por la altura del primer pico. La cohesividad se calcula como la relación de las áreas del segundo y el primer pico. La masticabilidad se calcula como el producto de la dureza, la cohesividad y la elasticidad (Castro-Briones *et al.*, 2009). Se analizan 8 muestras de cada lote de queso.

### 9.2.4 Análisis estadístico

Para analizar los parámetros de textura, se aplica un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores con interacción, considerando el tipo de cuajo (A, Q, V y M) y la adición de mTG (sí, no). Para los parámetros Aw, W e Y, se aplica el test de Kruskal-Wallis para estudiar el efecto de la adición de mTG y el test de U de Mann-Whitney para evaluar el efecto del tipo de coagulante (Granato *et al.*, 2014).

El análisis de componentes principales (PCA) se aplica para identificar los factores subyacentes (parámetros de textura, Aw, W e Y) que explican el patrón de correlaciones dentro del conjunto de variables observadas. El promedio de cada muestra para cada variable se utiliza para construir la matriz de datos para el PCA. Las variables no tienen las mismas unidades, por lo tanto, se escalan para dar el mismo peso a cada una (Lê *et al.*, 2008; Granato *et al.*, 2018).

Los cálculos estadísticos se realizan utilizando el software IBM SPSS Statistics 20 para Windows (IBM, Armonk, NY, EE. UU.) para realizar el ANOVA y R (R Core Team, 2018), usando el paquete FactoMineR, para el resto de los análisis estadísticos (Lê *et al.*, 2008).

Se consideran estadísticamente significativas aquellas diferencias con un nivel de significación  $p < 0.05$ .

## 9.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.3.1 Efecto del tipo de cuajo

La tabla 9.1 muestra los resultados de Aw, del contenido de agua (W) y del rendimiento quesero en las muestras elaboradas sin la adición de mTG.

Tabla 9.1. Resultados de la actividad de agua ( $A_w$ ), del contenido en agua (W) y del rendimiento (Y) de los quesos elaborados con los diferentes cuajos estudiados (sin mTG). Nivel de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ .

Tipo de cuajo	$A_w$	W(% w/w)	Rendimiento (%)
Animal	0.990±0.000	63.79±0.00	17.78
Quimosina	0.990±0.003	63.60±0.03	20.19
Vegetal	0.990±0.004	68.02±0.01	19.83
Microbiano	0.990±0.001	68.91±0.01	16.57

Los valores  $A_w$  no se ven afectados por el tipo de cuajo, mostrando valores alrededor de 0.99.

El contenido en agua es similar en los quesos elaborados con cuajo animal y quimosina recombinante, pero inferior al obtenido en los quesos coagulados con cuajo vegetal y microbiano. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) entre los valores obtenidos.

Con respecto al rendimiento, el valor más bajo se obtiene al usar el cuajo microbiano (16.6%) y el más alto usando quimosina recombinante (20.2%).

Los valores medios y las desviaciones estándar de los parámetros obtenidos del TPA se presentan en las figuras 9.2 y 9.3.

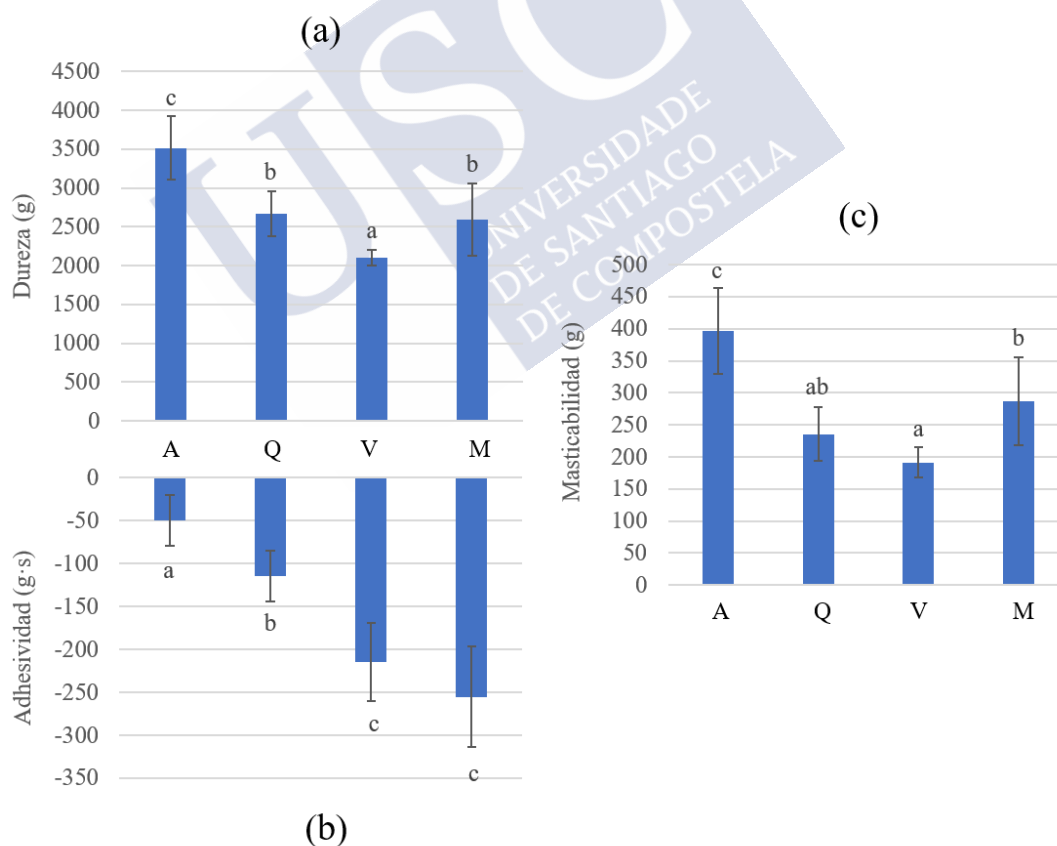
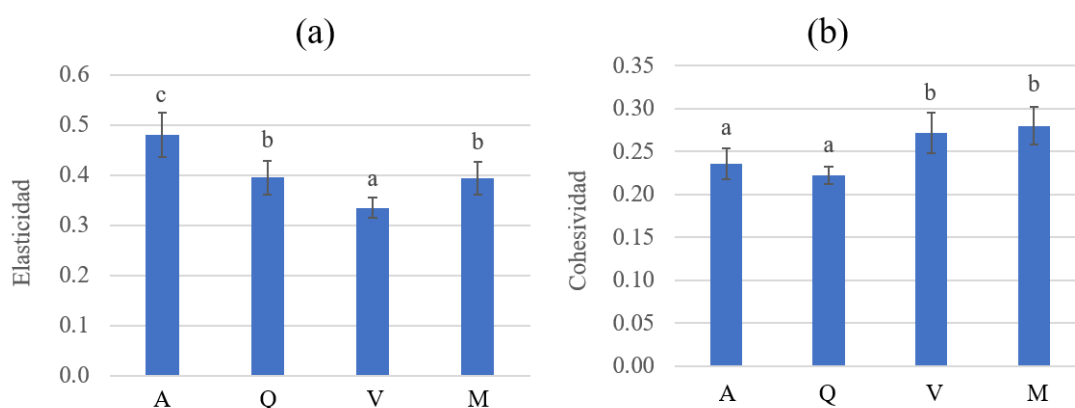


Figura 9.2. Valores medios y desviación estándar de la dureza, la adhesividad y la masticabilidad de los quesos elaborados con los diferentes tipos de cuajo (A, cuajo de ternero; Q, quimosina recombinante; V, cuajo vegetal y M, cuajo microbiano). Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre las muestras coaguladas con diferentes cuajos ( $p < 0.05$ ).



**Figura 9.3.** Valores medios y desviación estándar de la elasticidad y la cohesividad de los quesos elaborados con los diferentes tipos de cuajo (A, cuajo de ternero; Q, quimosina recombinante; V, cuajo vegetal y M, cuajo microbiano). Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre las muestras coaguladas con diferentes cuajos ( $p < 0.05$ ).

Los quesos obtenidos con cuajo animal son significativamente más duros que los demás quesos ( $p < 0.05$ ) (Figura 9.2a). Los quesos elaborados con quimosina y los elaborados con cuajo microbiano muestran una dureza intermedia (26721.46 y 2594.43 g, respectivamente). La utilización de cuajo vegetal da lugar a quesos que son significativamente más blandos que los obtenidos con los otros cuajos ( $p < 0.05$ ). Los quesos obtenidos con cuajo animal son un 40.17% más duros que los obtenidos con cuajo vegetal (2101.74 g).

Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la adhesividad de los quesos en función del cuajo utilizado. Los quesos coagulados con cuajo animal muestran la menor adhesividad (-49.96 g·s). La adhesividad más alta se observa en los quesos obtenidos con cuajo microbiano (-255.33 g·s), aunque no presenta diferencias significativas con la que presentan los quesos obtenidos por cuajo vegetal (Figura 9.2b). Con el cuajo microbiano se obtienen quesos un 80.43% de adhesividad mayor que los elaborados con cuajo animal.

La masticabilidad muestra la misma tendencia que la dureza (Figuras 9.2c). Los valores más bajos se observan en el queso coagulado con cuajo vegetal y los más altos cuando se usa como coagulante el cuajo animal.

El queso obtenido con cuajo animal presenta los valores más altos de elasticidad, seguido de los quesos coagulados con quimosina y los coagulados con cuajo microbiano (Figura 9.3a). De nuevo, el cuajo vegetal da lugar a los valores más bajos. En cuanto a la cohesividad (Figura 9.3b), los valores más altos se obtienen utilizando el cuajo vegetal y el microbiano. Los valores más bajos se identifican en las muestras coaguladas con cuajo animal y las coaguladas con quimosina. La quimosina y el cuajo animal dan lugar a quesos con una cohesividad similar, pero significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a la obtenida usando cuajo vegetal o microbiano. La diferencia entre cohesividad del queso coagulado con cuajo microbiano y el elaborado con quimosina es del 21.43%.

### 9.3.2 Efecto de la adición de mTG

Con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de transglutaminasa se estudian los quesos elaborados con los 4 cuajos de manera independiente (Tabla 9.2).

Tabla 9.2. Resultados de la actividad de agua (Aw), del contenido en agua (W) y del rendimiento para los quesos tratados con mTG. Nivel de significación: \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.001.

Tipo de cuajo	Aw	W (% w/w)	Rendimiento (%)
Animal	0.987±0.001	67.59±0.04	18.47
Quimosina	0.991±0.002*	66.31±0.13	19.61
Vegetal	0.989±0.002*	67.54±0.03	17.84
Microbiano	0.986±0.002	68.81±0.01	17.08

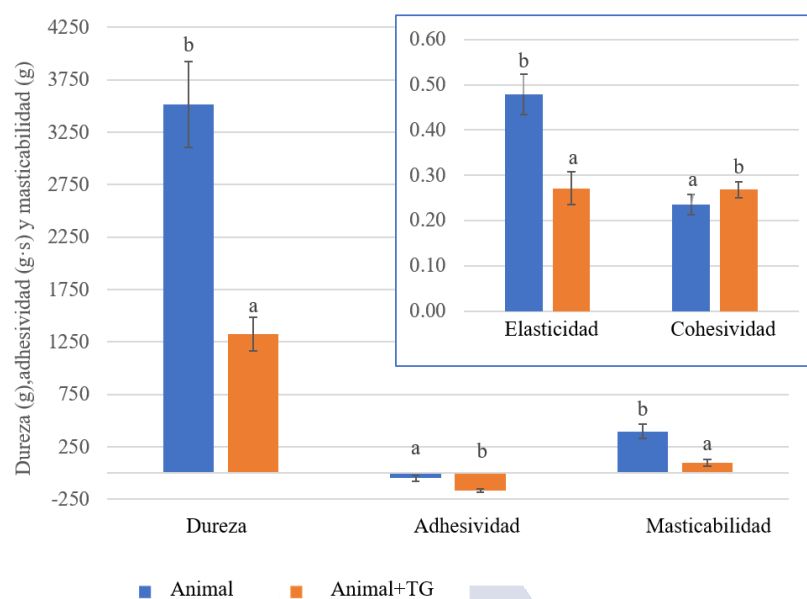
Comparando los quesos obtenidos con mTG con los controles sin mTG, los valores de Aw de los quesos elaborados con mTG (Tabla 9.2) son menores que en los quesos control sin mTG (Tabla 9.1), excepto para los quesos coagulados con quimosina. La adición de mTG aumenta el contenido de agua de las muestras coaguladas con cuajo animal y las elaboradas con quimosina, 3.8 y 2.7% respectivamente en comparación con los correspondientes controles sin mTG (Tablas 9.1 y 9.2), aunque sin diferencias estadísticamente significativas entre la muestra con mTG y la muestra control para ninguno de los coagulantes utilizados.

Al comparar entre sí los quesos elaborados con mTG y los diferentes cuajos, se observa que los valores de Aw de los quesos elaborados con quimosina y cuajo vegetal son significativamente mayores que los elaborados con cuajo animal y microbiano.

En cuanto al rendimiento, aunque no se detectan diferencias estadísticamente significativas en el queso coagulado con quimosina recombinante es en el que se obtiene un mayor rendimiento.

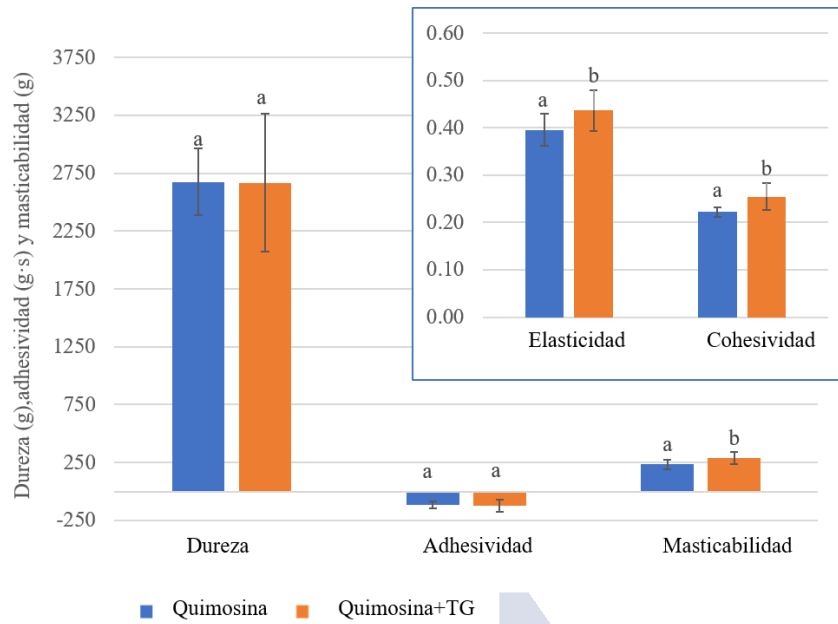
La Figura 9.4 muestra los resultados de los parámetros del perfil de textura instrumental (TPA) obtenidos para el queso coagulado con cuajo animal con y sin adición de mTG. Los quesos coagulados con cuajo animal y adicionados de mTG muestran una dureza un 62.19% inferior respecto a los quesos sin mTG.

En cuanto a la adhesividad, la muestra coagulada con cuajo animal también se ve afectada por la adición de mTG (p<0.05). Los valores de adhesividad pasan de -49.96 a -167.93 g·s cuando se añade mTG. El valor de masticabilidad disminuye en un 75.09% cuando se añade mTG. El valor más alto para la elasticidad se observa en la muestra coagulada con cuajo animal sin mTG. Cuando se incorpora la mTG, la elasticidad disminuye en un 43.75%. La adición de mTG es responsable de un aumento en la cohesividad del 11.11% en las muestras tratadas con cuajo animal (A+TG) en comparación con la muestra no tratada (A).



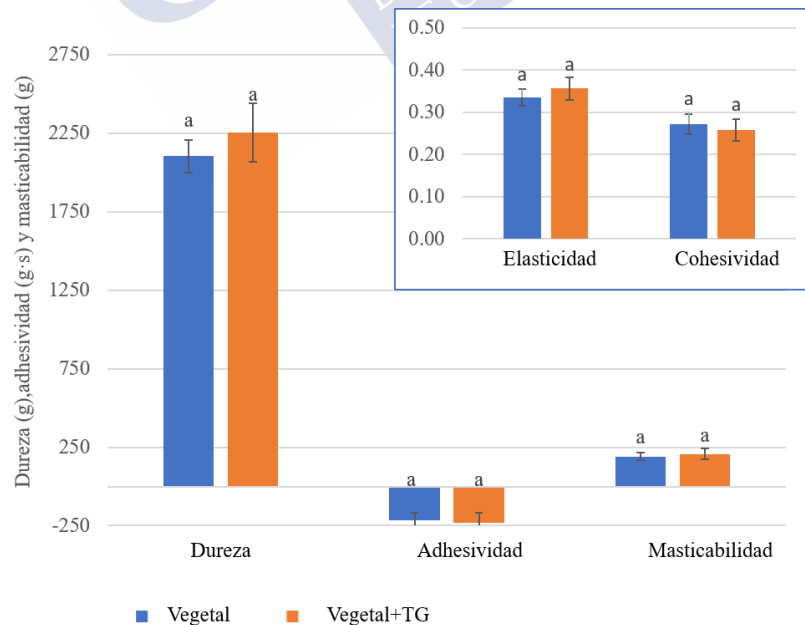
**Figura 9.4.** Valores medios y desviación estándar para los parámetros de TPA (dureza, adhesividad, elasticidad, masticabilidad, elasticidad y cohesividad) de queso coagulado con cuajo animal sin mTG (barras azules) y con mTG (barras naranjas). Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre la muestra tratada con transglutaminasa microbiana (mTG) y la no tratada.

La figura 9.5 muestra los parámetros de TPA obtenidos para el queso coagulado con quimosina recombinante con y sin adición de mTG. Ni la dureza ni la adhesividad de los quesos coagulados con quimosina recombinante se ven afectados por la adición de mTG, con valores alrededor de 2670 g y -120 g-s, respectivamente. Contrariamente a lo que sucede con el queso elaborado con cuajo animal, la incorporación de mTG en la fabricación de quesos coagulados con quimosina recombinante aumenta significativamente la masticabilidad y la elasticidad (Figura 9.5), con un incremento del 19.2% para masticabilidad y del 9.1% para la elasticidad. La cohesividad también se incrementa al añadir la mTG, tal y como sucede con el cuajo animal.



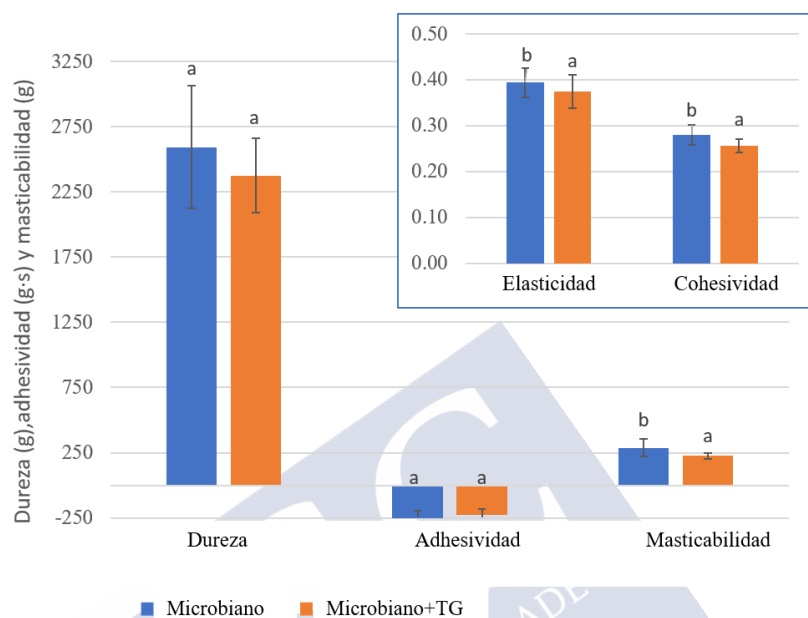
**Figura 9.5.** Valores medios y desviación estándar para los parámetros de TPA (dureza, adhesividad, elasticidad, masticabilidad, elasticidad y cohesividad) de queso coagulado con quimosina sin TG (barras azules) y con TG (barras naranjas). Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas entre la muestra tratada con transglutaminasa microbina (mTG) y la no tratada.

En la figura 9.6, se muestran los resultados de los parámetros de TPA obtenidos para el queso control (sin mTG) y para el queso elaborado con adición de mTG, y coagulados con cuajo vegetal. El tratamiento con mTG aumenta ligeramente casi todos los parámetros de textura. El aumento es inferior al 10%, excepto para la cohesividad que disminuye en un 16%. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ).



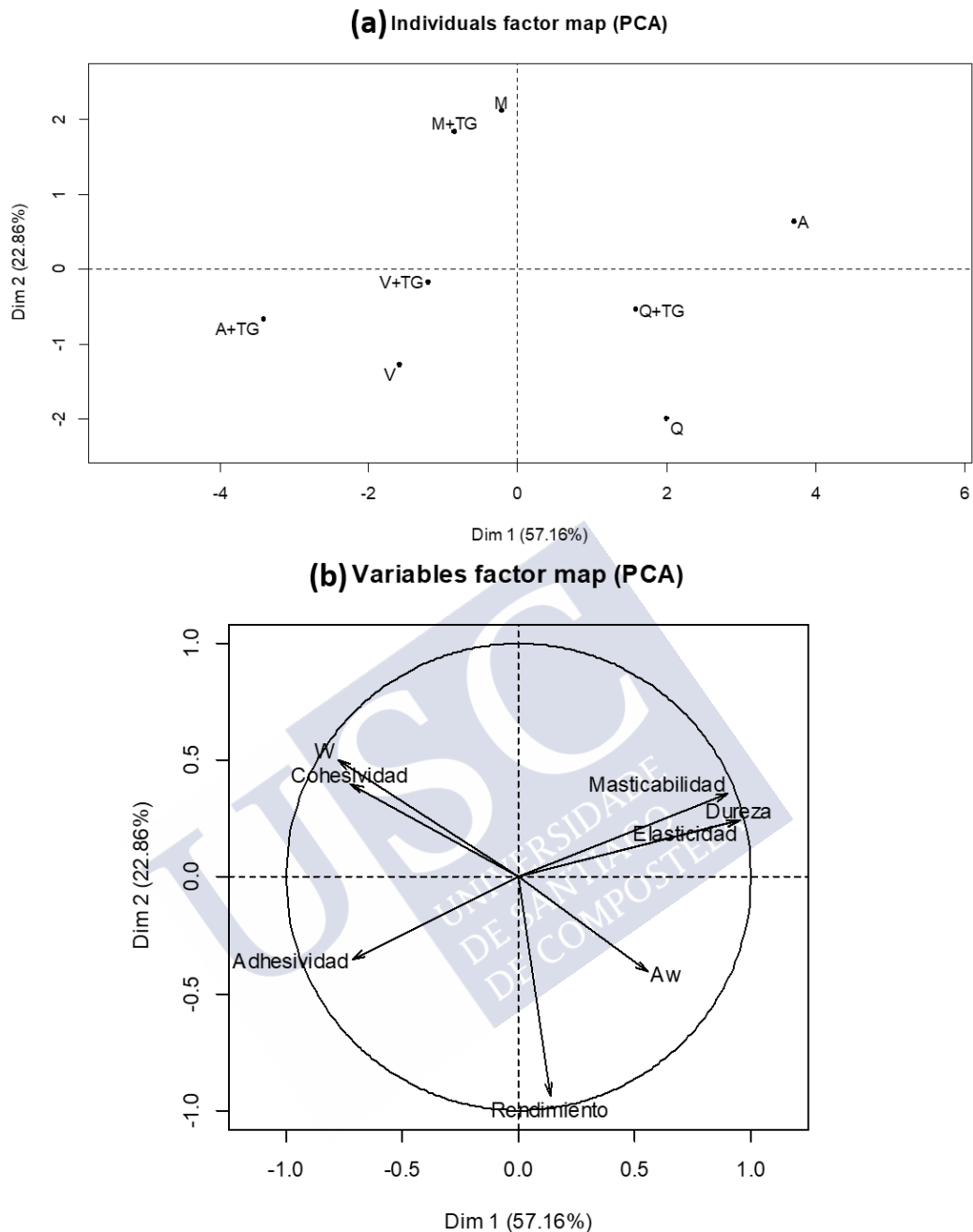
**Figura 9.6.** Valores medios y desviación estándar para los parámetros de TPA (dureza, adhesividad, elasticidad, masticabilidad, elasticidad y cohesividad) de queso coagulado con cuajo vegetal sin mTG (barras azules) y con mTG (barras naranjas). Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre la muestra tratada con transglutaminasa microbiana (mTG) y la no tratada.

La figura 9.7 presenta los valores de los parámetros del TPA obtenidos para el queso coagulado con el cuajo microbiano, con y sin adición de mTG. El tratamiento con mTG es el responsable de una disminución significativa en todos los parámetros de textura (masticabilidad, elasticidad y cohesividad), excepto la dureza. La masticabilidad es el parámetro más afectado por la adición de mTG, con una disminución del 21.18%.



**Figura 9.7.** Valores medios y desviación estándar para los parámetros de TPA (dureza, adhesividad, elasticidad, masticabilidad, elasticidad y cohesividad) de queso coagulado con cuajo microbiano sin mTG (barras azules) y con mTG (barras naranjas). Diferentes letras muestran diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre la muestra tratada con transglutaminasa (mTG) y la no tratada.

Finalmente, se realiza un PCA para facilitar la visión conjunta de las variables físico-químicas, los parámetros del TPA y el rendimiento obtenido para las diferentes muestras (Figura 9.8). La variabilidad explicada en la primera y la segunda dimensión representa el 84.16%.



**Figure 9.8. Análisis de Componentes Principales (PCA). Queso coagulado con cuajo animal (A), con quimosina recombinante (Q), con cuajo vegetal (V), con cuajo microbiano (M), con cuajo animal y mTG (A+TG), con quimosina recombinante y mTG (Q+TG), con cuajo vegetal y mTG (V+TG) y con cuajo microbiano y mTG (M+TG). Aw es la actividad de agua y W es el contenido en agua.**

En las figuras 9.8a y 9.8b se observa que la muestra con un mayor rendimiento y con un mayor valor de Aw en aquella que se elabora con quimosina recombinante sin mTG (Q). Los valores de rendimiento y Aw más bajos se asocian a las muestras de queso coaguladas con cuajo microbiano tanto con adición de mTG como sin ella (M y M+TG). Cuando las muestras se tratan con mTG, las diferencias entre los rendimientos al comparar los quesos elaborados con diferentes cuajos se reducen.



La muestra con un mayor rendimiento quesero es la que presenta un contenido en agua más bajo y una menor cohesividad (Figura 9.8b), aunque el test de Kruskal Wallis no detecta diferencias estadísticamente significativas entre las muestras, ni para el contenido de agua, ni para el rendimiento quesero.

Sin embargo, en otros estudios se observa una optimización del rendimiento quesero y un mayor contenido de agua en muestras de queso coaguladas con quimosina y tratadas con mTG en comparación con una muestra control sin mTG, siendo esas diferencias estadísticamente significativas (Pierro *et al.*, 2010). Por el contrario, y coincidente con los resultados obtenidos en el presente estudio, Pino *et al.* (2009) tampoco observan diferencias significativas sobre el contenido de agua de quesos elaborados con leche de cabra y coagulados con cuajo animal comparados con quesos coagulados usando un coagulante vegetal en polvo.

El rendimiento ligeramente inferior observado en las muestras Q+TG y V+TG, en comparación con las respectivas muestras control (Q y V), puede deberse al hecho de que la preincubación de la leche con la mTG puede inhibir la hidrólisis de la k-caseína durante la formación del coágulo, inhibiendo la agregación de las micelas. En consecuencia, la coagulación de la leche puede verse afectada (Bönisch *et al.*, 2008). Probablemente debido a este hecho, algunos investigadores que emplean quimosina como coagulante no son capaces de coagular la leche cuando ésta se incuba previamente con mTG durante 20 minutos a 20°C antes de añadir el coagulante. Sin embargo, se observa un aumento del rendimiento quesero cuando se añade la mTG después de la coagulación por acción de la quimosina (Cozzolino *et al.*, 2003). Resultados similares a los obtenidos por estos investigadores son observados por otros autores (Yüksel *et al.*, 2011). Sin embargo, en otro estudio, en el que se realiza una incubación previa con la mTG, y luego se agrega el coagulante, si consiguen la formación de la cuajada, aunque se observa un aumento en el tiempo de curado del queso (Domagała *et al.*, 2016).

Özer *et al.* (2013) también obtienen un mejor rendimiento quesero en un queso blanco en salmuera tratado con mTG y coagulado con cuajo animal. Señalan que el mayor rendimiento no solo se atribuye a una mayor retención de suero, relacionada con la alteración de las propiedades físicas de los geles de caseína, que presentan un tamaño de poro reducido, sino, también, a un ligero aumento de la fracción de proteína (Özer *et al.*, 2013).

Los resultados del presente estudio, muestran una fuerte correlación entre el contenido en agua (W) y la cohesividad (Figura 9.8). La muestra coagulada con quimosina (Q), es la menos cohesiva y la que presenta un menor contenido en agua. Los valores de cohesividad observados en la muestra coagulada con quimosina y la coagulada con cuajo animal son mayores cuando se incorpora la mTG (Figura 9.4 y 9.5), resultados que concuerdan con los hallazgos en investigaciones previas (Özer *et al.*, 2013).

Los valores más altos de dureza, de elasticidad y de masticabilidad se observan en la muestra coagulada con cuajo animal. Cuando este coagulante se combina con la TG, se observa una disminución en los valores de esos parámetros. En contraposición a lo observado en el presente estudio, otras investigaciones, en las que se elaboran quesos con leche de cabra pasteurizada y coagulados con cuajo animal y microbiano son significativamente menos duros y masticables en comparación con otros coagulados con cuajo vegetal y sin diferencias en la elasticidad y en la cohesividad (García *et al.*, 2012).

El efecto de la mTG sobre la dureza y la masticabilidad es especialmente relevante, cuando el queso se coagula con cuajo animal, ya que los quesos coagulados con cuajo animal y sin mTG muestran los valores más altos en la dureza y en la masticabilidad en comparación con los obtenidos para los otros coagulantes. Sin embargo, cuando se añade mTG (A+TG), este queso es el menos duro y con menor masticabilidad de todos. Así, las muestras con menor dureza, masticabilidad y elasticidad son las obtenidas con cuajo animal y mTG (A+TG), cuajo

vegetal (V) y cuajo vegetal con mTG (V+TG). No obstante, son los quesos con mayor adhesividad, lo que sugiere una correlación fuerte y negativa entre la adhesividad y los parámetros de dureza, de masticabilidad y de elasticidad. La adhesividad se ha incrementado agregando mTG en todas las muestras, excepto en la muestra coagulada con cuajo microbiano.

El mayor contenido en agua del queso obtenido con cuajo animal y mTG en comparación con el obtenido sin mTG puede ser el responsable de su textura más blanda, aunque esto no es confirmado por otros investigadores (Aaltonen, *et al.*, 2014), observándose valores de dureza más altos en quesos coagulados con cuajo animal y mTG en comparación con los controles a diferentes temperaturas de operación (30 y 34°C) (Özer *et al.*, 2013).

Las diferencias observadas en otras investigaciones con las obtenidas en el presente estudio, probablemente de deben a las diferencias en la temperatura de coagulación, que es mayor en nuestro ensayo. Mahmood and Sebo (2009), observan una mayor dureza en un queso blando coagulado con cuajo animal y tratado con mTG y un mayor rendimiento quesero.

El aumento en la dureza observado por otros investigadores al añadir la mTG, es probable que sea causado por la dosis de mTG y por el método de adición de ésta, ya que es incorporada al mismo tiempo que el coagulante (Escobar *et al.*, 2014). Probablemente estos hechos hacen que los rendimientos obtenidos por otros investigadores sean diferentes.

La literatura muestra que se observan diferencias en los parámetros de textura en los quesos elaborados con mTG añadido antes del cuajo en comparación con otros en los que se añade la mTG después del coagulante o al mismo tiempo que éste, concluyendo que los mejores resultados en términos de formación de gel se obtienen cuando se incorpora la mTG después del cuajo (De Sá and Bordignon-Luiz, 2010).

#### **9.4. CONCLUSIONES**

- El rendimiento en la elaboración de los quesos es siempre superior cuando se utiliza quimosina, si bien la adición de mTG disminuye las diferencias entre los quesos debido a un ligero aumento en el rendimiento de los quesos elaborados con los otros tipos de cuajo.
- La adición de mTG también afecta a los parámetros de textura. Los quesos coagulados con cuajo animal son los más afectados por el tratamiento con mTG, ya que ésta adición provoca una disminución significativa en la dureza, en la masticabilidad y en la elasticidad y un incremento de la adhesividad y cohesividad.
- Una incubación previa con mTG, antes de la adición del cuajo animal, puede ser una herramienta eficaz para la obtención de quesos.

#### **9.5 AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen a la Consellería de Cultura, Educación y Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia (Proyecto # ED431B 2016/009). También se agradece el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (España) para la realización de este trabajo (proyecto RTC2014-1835-2).

#### **9.6 BIBLIOGRAFÍA**

- Aaltonen, T., Huuononen, I. & Myllärinen, P. (2014). Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. *International Dairy Journal*, 38, 179-182.
- Almeida, C.M. & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4675-4686.
- Amira, A. Ben, Besbes, S., Attia, H. & Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant

rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making : A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 76-93.

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.

Ardelean, A.I., Otto, C., Jaros, D. & Rohm, H. (2012). Transglutaminase treatment to improve physical properties of acid gels from enriched goat milk. *Small Ruminant Research*, 106, 47-53.

Balabanova, T., Ivanova, M. & Vlaseva, R. (2017). Effect of rennet type and ripening period on chemical properties of Bulgarian white brined cheese. *International Food Research Journal*, 24, 2414-2418.

Bönisch, M.P., Heidebach, T.C. & Kulozik, U. (2008). Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids*, 22, 288-297.

Carmi, I.K. & Benjamin, O. (2017). Reduction in sodium content of fresh, semihard Tzfat cheese using salt replacer mixtures: taste, texture and shelf life evaluation. *International Journal of Dairy Technology*, 70, 354-364.

Castro-Briones, M., Calderón, G.N., Velázquez, G., Salud-Rubio, M., Vázquez, M. & Ramírez, J.A. (2009). Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 221-234.

Cozzolino, A., Pierro, D., 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.

De Sá, E.M.F. & Bordignon-Luiz, M.T. (2010). The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 243-251.

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.

Escobar, D., Arcia, P., Curutchet, A., Pelaggio, R., Urrestarazu, P. & Márquez Romero, R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Innotec*, 9, 24-30.

Ferreiro, T. & Rodríguez-Otero, J.L. (2018). Evolution and distribution of phospholipids in cheese and whey during the manufacturing of fresh cheese from cows' milk. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 820-823.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney, P.L. (2016). *Fundamentals of cheese science*. Ed Springer. Nueva York. ISBN 978-0-8342-1260-2.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2019). Sensory evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2088-2095.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, A., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial

- transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Bouteioal, K., Rodríguez, J., Roa, I. & López, M.B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science and Technology*, 92, 691-707.
- Gaspar, A.L.C. & Góes-Favoni, S.P. De. (2015). Action of microbial transglutaminase (MTGase) in the modification of food proteins: A review. *Food Chemistry*, 171, 315-322.
- Gauche, C., Vieira, J.T.C., Ogliari, P.J. & Bordignon-Luiz, M.T. (2008). Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry*, 43, 788-794.
- Ghanimah, M., Hanafy, N., Hassanein, A. & Hashim, M. (2018). Utilisation of water extract of green chilli pepper in the manufacture of low-fat fresh cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 693-698.
- Gharibzahedi, S.M., Koubaa, M., Barba, F.J., Greiner, R., George, 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.
- Granato, D., Araújo Calado, V.Ô.M. de & Jarvis, B. (2014). Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. *Food Research International*, 55, 137-149.
- Granato, D., Putnik, P., Kovačević, D.B., Santos, J.S., Calado, V., Rocha, R.S., Cruz, A.G. Da, Jarvis, B., Rodionova, O.Y. & Pomerantsev, A. (2018). Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 663-677.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. & Waelsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111-125.
- Guerra-Rodríguez, E. & Vázquez, M. (2014). Evaluation of a novel low-cost culture medium containing exclusively milk, potato and glycerol for microbial transglutaminase production by *Streptomyces mobaraensis*. *Chemical Engineering Research and Design*, 92, 784-791.
- Hayaloglu, A.A. & Karabulut, I. (2013). SPME/GC-MS characterization and comparison of volatiles of eleven varieties of Turkish cheeses. *International Journal of Food Properties*, 16, 1630-1653.
- Jacob, M., Jaros, D. & Rohm, H. (2011a). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 14-33.
- Jaros, D. & Rohm, H. (2017). Rennets: Applied Aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (editado por: P.L.H. McSweeney, P.F. Fox, P.D. Cotte & W.D. Everett). Pp. 53-67. Elsevier Ltd.
- Jacob, M., Nöbel, S., Jaros, D. & Rohm, H. (2011b). Physical properties of acid milk gels: Acidification rate significantly interacts with cross-linking and heat treatment of milk. *Food Hydrocolloids*, 25, 928-934.
- Jaros, D., Partschfeld, C., Henle, T. & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113-155.
- Johnson, M.E. (2017). A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy*

Science, 100, 9952-9965.

Katsiari, M.C., Alichanidis, E., Voutsinas, L.P. & Roussis, I.G. (2000). Proteolysis in reduced sodium Feta cheese made by partial substitution of NaCl by KCl. *International Dairy Journal*, 10, 635-646.

Kuraishi, C., Yamazaki, K. & Susa, Y. (2001). Transglutaminase: Its utilization in the food industry. *Food Reviews International*, 17, 221-246.

Lê, S., Josse, J. & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Software, Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical*, 25, 1-18.

Llamas-Arriba, M.G., Peirotén, Á., Puerta, A.I., Prieto, A., López, P., Pardo, M.Á., Rodríguez, E. & Dueñas, M.T. (2019). Heteropolysaccharide-producing bifidobacteria for the development of functional dairy products. *LWT-Food Science and Technology*, 102, 295-303.

Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2009). Effect of microbial transglutaminase treatment on soft cheese properties. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 37, 19-27.

Martins, I.M., Matos, M., Costa, R., Silva, F., Pascoal, A., Estevinho, L.M. & Choupina, A.B. (2014). Transglutaminases: Recent achievements and new sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 6957-6964.

Mazorra-Manzano, M.A., Perea-Gutiérrez, T.C., Lugo-Sánchez, M.E., Ramirez-Suarez, J.C., Torres-Llanez, M.J., González-Córdova, A.F. & Vallejo-Cordoba, B. (2013). Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. *Food Chemistry*, 141, 1902-1907.

Motoki, M. (1989). Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2613-2617.

Motoki, M. & Seguro, K. (1998). Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.

Özer, B., Hayaloglu, A.A., Yaman, H., Gürsoy, A. & Şener, L. (2013). Simultaneous use of transglutaminase and rennet in white-brined cheese production. *International Dairy Journal*, 33, 129-134.

Pierro, P. Di, Mariniello, L., Sorrentino, A., Valeria, C.L., Chianese, L., Porta, R., Di, P., Mariniello, L. & Sorrentino, A. (2010). Transglutaminase-induced chemical and rheological properties of cheese. *Food Biotechnology*, 24, 107-120.

Pinheiro, R., Oliveira, D.S., Rivas, B., Perego, P., Nogueira, M., Oliveira, D. & Converti, A. (2012). Co-metabolic models of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus bulgaricus* or *Lactobacillus acidophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, 62, 62-69.

Pino, A., Prados, F., Galán, E., McSweeney, P.L.H. & Fernández-Salguero, J. (2009). Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet. *Food Research International*, 42, 324-330.

R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.

Reis, P.J.M. & Malcata, F.X. (2011). Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101, 122-133.

Santiago-López, L., Aguilar-Toalá, J.E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B., Liceaga, A.M. & González-Córdova, A.F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption.

Journal of Dairy Science, 101, 3742-3757.

Selin, A., Demet, E., Çağım, A.Ç., Hasan, V., Asliye, K. & Mehmet, K. (2018). Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food Science & Nutrition*, 6, 1100-1108.

Shah, M.A. & Mir, S.A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking : a review, 5-16.

Sharma, R., Lorenzen, P.C. & Qvist, K.B. (2001). Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards crosslinking. *International Dairy Journal*, 11, 785-793.

Sousa, M.J. & Malcata, F.X. (1997). Comparison of Plant and Animal Rennets in Terms of Microbiological, Chemical, and Proteolysis Characteristics of Ovine Cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 74-81.

Sousa, M.J. & Malcata, F.X. (2002). Advances in the role of a plant coagulant (*Cynara cardunculus*) in vitro and during ripening of cheeses from several milk species. *Lait*, 82, 151-170.

Sumantha, A., Larroche, C. & Pandey, A. (2006). Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade. *Food Technology Biotechnology*, 211-220.

Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).

Yegin, S. & Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: Structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science and Technology*, 93, 565-594.

Yokoyama, K., Nio, N. & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447-454.

Yüksel, Z., Avci, E. & Erdem, Y.K. (2011). Modification of the renneting process in Berridge substrate by transglutaminase. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 365-371.

Zhi, N.N., Zong, K., Thakur, K., Qu, J., Shi, J.-J., Yang, J.-L., Yao, J. & Wei, Z.-J. (2017). Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. *CyTA-Journal of Food*, 16, 1-8.

Zhi, N.N., Zong, K., Thakur, K., Qu, J., Shi, J.-J., Yang, J.-L., et al. (2018). Development of a dynamic prediction model for shelf-life evaluation of yogurt by using physicochemical, microbiological and sensory parameters. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 42-49.



## 10. EFECTO DEL TIPO DE CUAJO Y DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA SOBRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES DEL QUESO

### Resumen

Una vez evaluado el efecto del tipo de cuajo y de la adición de transglutaminasa microbiana (mTG) sobre las características físico-químicas del queso fresco en el capítulo 9, se plantea este estudio con el objetivo de evaluar el efecto de estos factores sobre las propiedades sensoriales del queso fresco. Igualmente, se propone realizar el estudio de la correlación de los parámetros de textura sensorial con los parámetros de textura instrumental evaluados en el capítulo 9.

Los resultados indican que el queso coagulado con cuajo vegetal es el que presenta una mayor cantidad de exudado y que, en general, los quesos obtenidos usando mTG son menos granulosos, más solubles, más cremosos y muestran una mayor intensidad de aroma a leche y a queso fresco.

El efecto de la mTG sobre la humedad y la persistencia es diferente en función del tipo de cuajo utilizado, la mTG incrementa la percepción de humedad en los quesos coagulados con cuajo animal y con cuajo microbiano, mientras que la persistencia es mayor cuando se añade mTG a los quesos elaborados con cuajo animal y vegetal.

En cuanto a la correlación de los parámetros sensoriales con los instrumentales, se observa una correlación positiva de la cremosidad sensorial con la cohesividad y la adhesividad instrumental. Además, la granulosidad percibida a nivel sensorial se correlaciona positivamente con la masticabilidad, la elasticidad y la dureza medidas instrumentalmente, que a su vez se correlacionan negativamente con la solubilidad, con la cremosidad y con la humedad sensorial.

Se concluye que la mTG y los diferentes cuajos ensayados interactúan de manera diferente, modificando algunas propiedades sensoriales del queso, observándose, tanto desde el punto de vista sensorial como instrumental, que el efecto de la mTG es mayor en el queso coagulado con cuajo animal.

**Palabras Clave:** transglutaminasa; queso; perfil sensorial; panel entrenado; tipo de cuajo.



## 10.1 INTRODUCCIÓN

La coagulación enzimática de la leche requiere la presencia de cuajo, que es una mezcla de enzimas proteolítico-lipolíticas (quimosina, pepsina y lipasa), siendo la quimosina el componente clave del cuajo por ser el responsable de la ruptura de los enlaces peptídicos (Fox *et al.* 2016; Granados-Rivera *et al.* 2018).

La coagulación enzimática de la leche para la producción de queso ocurre en 2 fases. En la primera, se produce una proteólisis limitada, que hidroliza solo los enlaces peptídicos covalentes Fenilalanina<sup>105</sup>-Metionina<sup>106</sup>. Esta hidrólisis tiene lugar por la acción de las proteasas, que provocan modificaciones específicas en la micela  $\kappa$ -caseína, desestabilizándola. Esta desestabilización se produce por la separación de la región hidrofílica (para- $\kappa$ -caseína), que se une a la micela, mientras que la fracción más pequeña de la  $\kappa$ -caseína, el caseinomacropéptido (CMP), se libera y permanece en solución en el suero. En un segundo paso, las modificaciones físico-químicas de las micelas de para- $\kappa$ -caseína continúan en presencia de  $\text{Ca}^{+2}$  a temperaturas superiores a 20°C y se produce un agregado de las micelas, formando una matriz de proteína que se conoce como coágulo o gel (Fox *et al.*, 2016; Vázquez-Velázquez *et al.*, 2018).

A lo largo de los años, se proponen diferentes fuentes de coagulantes para la fabricación del queso, pero solo unas pocas son aceptadas debido a las características sensoriales obtenidas (Selin *et al.*, 2018; Akbar *et al.*, 2019). Tradicionalmente, el cuajo se obtiene de los abomasos de animales lactantes como terneros, cerdos, corderos o cabritos, siendo el cuajo de ternero el más utilizado durante mucho tiempo para la producción quesera.

Debido al aumento en la producción de queso, surge un problema de suministro de cuajo de ternero y, además, los costes de producción son altos. Por lo tanto, es necesario encontrar alternativas para reemplazar este tipo de cuajo, sin reducir la calidad del producto (Selin *et al.*, 2018; Kiss *et al.*, 2019). Los sustitutos deben cumplir ciertos requisitos: mostrar una alta especificidad por la  $\kappa$ -caseína y una baja actividad proteolítica al pH y a la temperatura habituales en la fabricación de queso (Alves *et al.*, 2015). Así, las quimosinas recombinantes, varias proteasas obtenidas de fuentes vegetales y microbianas son investigadas como alternativas al cuajo de ternero en la producción artesanal de queso.

Las proteasas de origen vegetal, como los extractos acuosos crudos de las flores de *Cynara cardunculus*, se utilizan desde la antigüedad como coagulantes en la producción de quesos de leche de oveja y cabra en diferentes regiones del sur de Europa. Sin embargo, la escasa purificación conlleva asociada una falta de homogeneidad en los productos obtenidos. Sin embargo, estudios recientes, confirman su viabilidad, desde un punto de vista económico, en la producción de queso a gran escala (Uresti *et al.*, 2003a; Almeida and Simões, 2018; Selin *et al.*, 2018).

La calidad sensorial es un factor determinante para el éxito del mercado de los alimentos. Además de las propiedades nutricionales, es necesario que el consumidor experimente satisfacción al consumir un producto, como puede ser el queso. Por tanto, identificar las características sensoriales de un producto, es otra etapa más a tener en cuenta en el diseño y formulación de un alimento.

En la industria alimentaria, es frecuente realizar diferentes mediciones físico-químicas. Estas medidas pueden proporcionar datos fiables sobre las características del producto, aunque el análisis sensorial es el mejor método de evaluación disponible para la industria alimentaria para establecer el perfil sensorial de un producto (Amerine *et al.*, 1965; King *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2005; Etaio *et al.*, 2013).

Hoy en día, tanto en la industria láctea, como en investigación, se observa un interés creciente focalizado en el desarrollo de nuevos ingredientes y productos con una características

físicas y funcionales novedosas, que permitan mejorar las características sensoriales y nutricionales de los productos lácteos y, así, satisfacer las demandas de los consumidores. Por lo tanto, la aplicación de enzimas como la transglutaminasa, están despertando un gran interés.

La transglutaminasa (mTG) o glutaminil-péptido-amina  $\gamma$ -glutamyl transferasa es capaz de formar enlaces cruzados covalentes tanto en enlaces isopeptídicos intermoleculares como intramoleculares, en alimentos formados por una matriz proteica, catalizando una reacción de transferencia de grupos acilo entre un grupo  $\gamma$ -carboxiamida en el residuo de glutamina unida a la proteína (donante de acilo) y la lisina (receptor de acilo) (Uresti *et al.*, 2003b).

La TG está presente en diferentes tejidos animales, en la sangre, en algunos tejidos vegetales y en microorganismos (Yokoyama *et al.*, 2004). La principal ventaja de la de origen microbiano (mTG) es su independencia del  $\text{Ca}^{+2}$  y que muestra actividad en un amplio rango de temperaturas y pH. La mTG muestra una actividad elevada a temperaturas entre 40 y 50°C y a pH 6.0 y pierde actividad a 70°C (Yokoyama *et al.*, 2004; Jaros *et al.*, 2006). El pH óptimo para la actividad de la mTG oscila entre 5 y 7, mostrando cierta actividad residual a pH 4 y 9 (Ando *et al.*, 1989). Además, la mTG está considerada como sustancia GRAS (sustancia generalmente reconocida como segura) por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) desde 1998.

Son muchas las aplicaciones de la mTG en la industria alimentaria, siendo de gran interés su aplicación en productos lácteos ya que la caseína es un excelente sustrato para la mTG (Jaros *et al.*, 2006; Özrenk, 2006; García-Gómez *et al.*, 2018; García-Gómez *et al.*, 2019a,b,c). Las principales ventajas de la incorporación de mTG a la producción de queso es el aumento de la capacidad de retención de agua y, en consecuencia, el rendimiento quesero y la mejora de la calidad sensorial. La mTG se usa principalmente en queso blando, ya que la incorporación de mTG en la elaboración de quesos duros podría provocar un aumento en el tiempo de coagulación y retrasar la maduración debido a la posible actividad residual de la enzima (Romeih and Walker, 2017).

Se proponen diferentes patrones para la adición de mTG en la fabricación de queso: i) la mTG puede incorporarse antes de la pasteurización, por lo tanto, la mTG estará inactiva, debido al tratamiento térmico, cuando se agregue el coagulante; ii) puede añadirse después del corte de la cuajada; y iii) simultáneamente con el coagulante (DeJong and Koppelman, 2002; Romeih and Walker, 2017).

La adición de mTG afecta las propiedades físico-químicas de la leche, alterando el proceso de coagulación. Algunos autores consideran que la reticulación, por acción de la mTG, afecta a la hidrólisis de la  $\kappa$ -caseína, es decir, inhibe o retrasa la primera fase del proceso de coagulación (O'Sullivan *et al.*, 2002). Este efecto se atribuye al hecho de que la mTG tiene una alta afinidad por las fracciones de  $\kappa$ -caseína, ya que 2 de sus 4 posibles residuos de glutamina están en la región hidrofílica de CMP, produciendo así la reacción de reticulación entre la mTG y la  $\kappa$ -caseína, evitando la liberación del CMP y la para- $\kappa$ -caseína (Bönisch *et al.*, 2008). Sin embargo, otros investigadores sugieren que la adición de mTG también afecta la segunda fase de la coagulación, retrasando o inhibiendo la agregación de las micelas de para- $\kappa$ -caseína, lo que disminuye la fuerza del coágulo. Por lo tanto, concluyen que la reticulación con mTG afecta las dos etapas de la coagulación, aunque parece ser más intensa en la segunda etapa ya que afecta a la firmeza del gel, más que el tiempo de coagulación (Bönisch *et al.*, 2008).

Algunos autores sugieren que la incubación de la leche con mTG antes de la adición del cuajo, o incluso la adición simultánea con el cuajo, conlleva asociado un efecto inhibitorio más pronunciado de la mTG sobre la formación de la cuajada, llegando en algunos casos a la no formación del coágulo (O'Sullivan *et al.*, 2002). Por el contrario, otros investigadores obtienen un queso cottage con propiedades de textura mejoradas cuando la leche se incuba con mTG

antes de la adición del cuajo, obteniéndose un mayor rendimiento y un queso más suave al evitar la reticulación excesiva (Mazuknaite *et al.*, 2013). También se obtienen rendimientos más altos con la adición simultánea de la mTG con el cuajo (Bönisch *et al.*, 2008; Domagała *et al.*, 2016). Las diferencias en los resultados obtenidos en los diferentes estudios, probablemente se deben a las diferentes condiciones operación, ya que tanto el pH, como la temperatura, afectan en gran medida la formación de coágulos, además del efecto de la dosis de mTG.

Özer *et al.* (2012) observan que la adición simultánea de la mTG con el cuajo, implica un aumento en la dosis de mTG que conlleva un mayor tiempo de coagulación y una disminución de la fuerza del coágulo. Al aumentar la temperatura, estos efectos se intensifican, además de disminuir el rendimiento.

Otros autores, sugieren que la mTG debe incorporarse después de la adición de cuajo para obtener mejores resultados en cuanto a la formación de cuajada (Yüksel *et al.*, 2011).

Algunos estudios comparan el efecto de diferentes tipos de cuajo sobre las propiedades sensoriales de los quesos, principalmente realizados con leche de cabra y oveja (Tejada and Cayuela, 2006; Prados and Pino, 2007; Tejada *et al.*, 2007; Prados *et al.*, 2008; Galán *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012), ya que solo se localiza un estudio que evalúa el efecto de diferentes cuajos en quesos elaborados con leche de vaca (Medina *et al.*, 1992), aunque lo hace de forma genérica y sin establecer un perfil sensorial descriptivo.

Por otro lado, el efecto de la mTG en productos lácteos es estudiado ampliamente en yogur (Lorenzen *et al.*, 2002; Özer *et al.*, 2007; Aprodu *et al.*, 2011; Şanlı *et al.*, 2011; Wróblewska *et al.*, 2011; Tsevdou *et al.*, 2013). Sin embargo, los estudios sobre el efecto de la mTG en las propiedades sensoriales de los quesos son escasos (Mahmood and Sebo, 2009; De Sá and Bordignon-Luiz, 2010).

El efecto conjunto de la adición de mTG y el tipo de coagulante sobre las propiedades físico-químicas y texturales del queso es estudiado recientemente (García-Gómez *et al.*, 2019d). Sin embargo, no hay estudios sobre las propiedades sensoriales de quesos elaborados con diferentes cuajos y mTG. Por esta razón, este estudio tiene como objetivo dilucidar el efecto de la mTG combinado con los principales coagulantes presentes en el mercado (cuajo animal de ternero, la quimosina recombinante (*Kluyveromyces lactis*), el cuajo vegetal (*Cynara cardunculus*) y el cuajo microbiano (*Rhizomucor miehei*)) sobre las propiedades sensoriales de los quesos elaborados con leche de vaca entera pasteurizada.

## 10.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 10.2.1 Materias primas

Los quesos se elaboran a partir de leche de vaca comercial entera pasteurizada (3.1% % de proteína, 3.6% de grasa y 3.6% de extracto seco y se utilizan 4 coagulantes comerciales: cuajo animal de ternero (actividad coagulante: 180 UC·g<sup>-1</sup>, 95±5%, quimosina y pepsina≤5%), cuajo vegetal de *Cynara cardunculus* (actividad coagulante>120 UC·g<sup>-1</sup>, cuajo microbiano de *Rhizomucor miehei* (actividad coagulante: 200 UC·g<sup>-1</sup>) y quimosina recombinante de *Kluyveromyces lactis* (actividad coagulante: 180 UC·g<sup>-1</sup>). Todos los coagulantes son suministrados por Abiasa (Tui, Pontevedra, España).

La mTG es producida en nuestro laboratorio, siguiendo el proceso de fabricación descrito en la patente española ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012). Previamente a su aplicación se mide la actividad de la mTG mediante un procedimiento de espectrofotometría (Portilla-Rivera *et al.*, 2009). La actividad medida previamente a su uso es de 470 U·g<sup>-1</sup>. Utilizando el mismo método se determina si hay actividad residual de la mTG en los quesos.

### 10.2.2 Elaboración del queso

Los quesos se elaboran como se describe en García-Gómez *et al.* (2019d) (capítulo 9, apartado 9.2.2). A continuación, las muestras de queso se desmoldan y se almacenan en refrigeración a 4°C al menos 24 h antes de ser analizadas, tal y como se muestra en la figura 10.1.

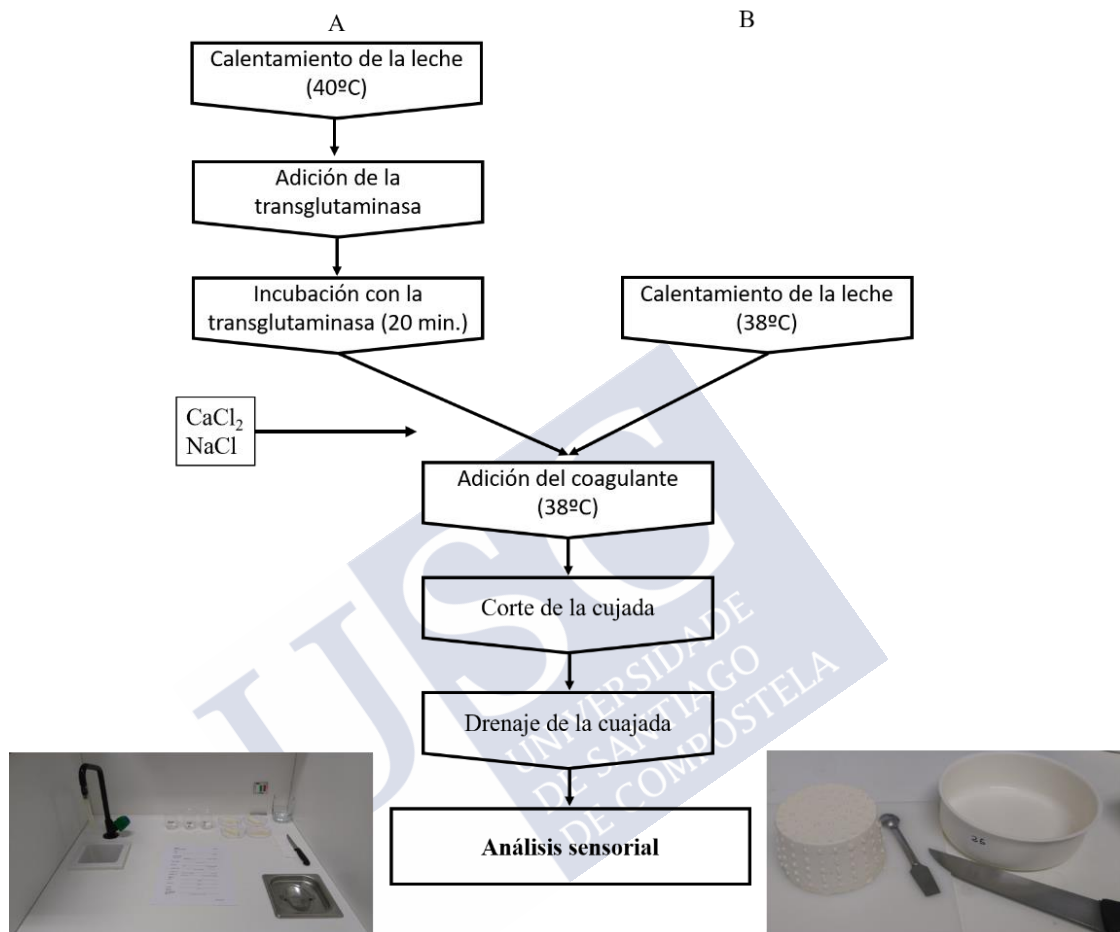


Figura 10.1. Diagrama de flujo para la producción de queso con mTG (A) y sin mTG(B).

### 10.2.3 Análisis de los parámetros de textura

El procedimiento para las medidas instrumentales de textura se describe en García-Gómez *et al.* (2019d) (capítulo 9, apartado 9.2.3).

### 10.2.4 Evaluación sensorial descriptiva cuantitativa

La evaluación sensorial se lleva a cabo en una sala de cata que cumple con los estándares de análisis sensorial, equipada con 10 cabinas individuales, separadas por paneles lo suficientemente altos y anchos para aislar a los diferentes catadores (UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014, 2014). Se siguen las etapas propuestas para realizar evaluaciones sensoriales fiables: selección de panelistas, entrenamiento básico, entrenamiento específico, validación del método y de los catadores (Etaio *et al.*, 2010).

Para la selección de catadores y para el entrenamiento básico, se realiza una preselección inicial, teniendo en cuenta aspectos sobre la salud (es decir, alergias o intolerancias alimentarias), el interés, la motivación, la disponibilidad y la no aversión hacia los productos

lácteos en los candidatos; estos datos se solicitan mediante un cuestionario (Meilgaard et al., 2016). Se realizan pruebas de selección adicionales para evaluar las capacidades sensoriales (pruebas de sabores básicos, prueba de reconocimiento de olores y pruebas sobre el uso de escalas (UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014, 2014; Meilgaard et al., 2016).

La formación básica de los catadores se lleva a cabo de acuerdo con las normas estandarizadas de análisis sensorial (UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014, 2014). El objetivo de este paso es dotar a los catadores de habilidades sensoriales.

El panel está compuesto por 15 catadores seleccionados que se reúnen una vez por semana.

El conjunto de descriptores, también se genera según los estándares de análisis sensorial (UNE 87027:2018, 2018). Se realizan diferentes sesiones con la finalidad de obtener el conjunto de descriptores, las definiciones, las referencias para las escalas lineales no estructuradas de 10 cm y para establecer los procedimientos de evaluación de los diferentes descriptores que permiten evaluar el queso. Los panelistas evalúan diferentes quesos frescos comerciales tipo Burgos para identificar el conjunto de descriptores más convenientes para evaluar los estímulos sensoriales percibidos.

El entrenamiento de los catadores, es una etapa clave en la evaluación sensorial descriptiva. El entrenamiento específico en el producto mejora el acuerdo entre el significado de los términos descriptivos, familiariza a los catadores con los procedimientos y escalas de evaluación, contribuye a mejorar el consenso del panel y la capacidad de discriminación entre los productos (Amerine *et al.*, 1965; King *et al.*, 2001). Por lo tanto, el control de la fiabilidad del panel debe ser una etapa rutinaria del análisis sensorial descriptivo (King *et al.*, 2001). Un escaso entrenamiento sobre el producto puede tener como consecuencia sobre la fiabilidad del panel, como son una escasa reproductibilidad, discriminación y consenso, debido a la gran variabilidad individual en las evaluaciones (Bárceñas *et al.*, 2004).

Para evaluar la eficacia y fiabilidad general del panel, una vez finalizado el entrenamiento, cada catador evalúa 3 muestras comerciales de queso fresco, utilizando el conjunto de los 15 descriptores previamente seleccionados durante 2 sesiones de cata.

Una vez que se comprueba la fiabilidad del panel, se procede a evaluar las muestras de queso objeto de estudio para establecer su perfil sensorial.

Tanto para evaluar la eficacia y fiabilidad del panel, como para establecer el perfil sensorial, las muestras de queso se sirven a temperatura ambiente (alrededor de 20°C) codificadas con códigos aleatorios de 3 dígitos en platos. Las evaluaciones se realizan según un diseño aleatorio de bloques completos, proporcionando agua a los catadores para enjuagar la boca entre muestras.

### **10.2.5 Análisis estadístico**

Para la selección del conjunto de descriptores, se realiza un Análisis de Componentes Principales (PCA) para reducir el número inicial de descriptores propuestos por los catadores. El PCA hace posible determinar la relación entre los descriptores seleccionados, identificar términos relacionados y seleccionar aquellos que más discriminan entre muestras (Pereira *et al.*, 2015). La rotación varimax permite mejorar la asignación de las variables a los componentes principales. El método de selección consiste en seleccionar aquellos términos con la mayor carga/peso (en valor absoluto) en el primer componente principal. Luego, entre las variables restantes, se eligen las variables con la mayor carga en valor absoluto en el segundo componente principal y, así, sucesivamente (Sahmer and Qannari, 2008).

La evaluación global del panel entrenado se evalúa utilizando un modelo de análisis de varianza (ANOVA) de 3 factores (muestra, catador y sesión de cata) con interacción. En este modelo, el efecto principal de la muestra se utiliza para analizar la capacidad discriminativa del

panel, el efecto del catador se considera para detectar diferencias en el uso de la escala entre los catadores, la interacción muestra:catador permite evaluar el consenso del panel y las interacciones muestra:sesión y catador:sesión se utilizan para evaluar la repetibilidad de los catadores.

Para las evaluar las diferencias entre el perfil sensorial de cada muestra, se realiza un análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores fijos con interacción. Los factores son cuajo (A, Q, V y M) y la adición de mTG (sí, no). Cuando la interacción de los factores es estadísticamente significativa para algún descriptor, este descriptor se estudia más en profundidad, segmentando la matriz de datos en función del tipo de cuajo y/o adición o no de mTG. El test HSD de Tukey, se aplica para realizar las comparaciones entre los diferentes tipos de cuajo y el test de t de Student para muestras apareadas permite hacer las comparaciones por parejas (muestras con mTG versus muestras sin mTG). Las diferencias a un nivel de  $p < 0.05$  se consideran estadísticamente significativas.

El análisis factorial múltiple (MFA) se realiza para relacionar las mediciones obtenidas del análisis de perfil de textura instrumental (TPA) con el perfil de textura sensorial.

Los análisis estadísticos se realizan con IBM SPSS Statistics 24 y con el lenguaje R (R Core Team, 2018). Se utilizan los paquetes FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) y agricolae (De Mendiburu, 2017) de R.

## 10.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.3.1 Glosario de descriptores: generación y reducción de descriptores

La ficha de cata, incluyendo los descriptores más adecuados para la evaluación sensorial del queso, se desarrolla según las normas estandarizada de análisis sensorial (UNE 87027:2018, 2018).

En la primera etapa, los panelistas proponen 44 descriptores para describir las diferencias entre diferentes quesos frescos comerciales. Se hace un cribado de descriptores, descartando los descriptores hedónicos, los sinónimos o términos inadecuados. Esta primera clasificación de descriptores da lugar a una lista de 33 descriptores.

En la segunda etapa, cada catador evalúa la intensidad percibida de cada uno de los 33 descriptores, utilizando una escala estructurada de 5 puntos que varía de 0 (no percibido) a 5 (fuertemente percibido). En base a estos resultados, se lleva a cabo una reducción cuantitativa excluyendo aquellos términos que muestran una media geométrica (M) inferior al 25%. De este modo, el número de descriptores se reduce a 22.

A continuación, se realiza un PCA para reducir aún más el conjunto de descriptores. Para obtener una explicación del 80% de la variabilidad, se necesitan 9 componentes. La selección de los 15 descriptores finales se realiza por consenso entre el director del panel y los catadores en base a su contribución a los componentes y a la existencia de correlaciones entre los descriptores en cada componente.

El conjunto final de 15 términos, está formado por descriptores visuales (presencia de suero), descriptores de textura (friabilidad, solubilidad, humedad, granulosidad, harinosidad y cremosidad) y descriptores de sabor y aroma (sabor ácido, sabor amargo, sabor salado, intensidad de aroma a queso fresco, intensidad de aroma a leche, aromas extraños, retrogusto y persistencia).

En la última etapa, por consenso con los catadores, se establecen las definiciones detalladas y técnicas de medida para cada uno de los descriptores. Para establecer las intensidades de la escala se utilizan diluciones y productos comerciales como referencias. Los descriptores se cuantifican usando escalas no estructuradas de 10 cm, en las que se mide la intensidad del

estímulo percibido, donde una calificación de 0 se considera "nula o ligera" y una calificación de 10 se considera una intensidad "alta". Los descriptores seleccionados, las definiciones y las referencias se resumen en la tabla 10.1.

**Tabla 10.1 Definición, procedimiento de evaluación, escalas y referencias utilizadas para la evaluación de los atributos sensoriales del queso.**

Descriptor	Definición	Escalas y referencias	
<b>Apariencia</b>			
Presencia de suero	Observación visual de suero.	Ausencia	Cantidad similar a una cucharilla de café
<b>Textura en boca</b>			
Friabilidad	Capacidad para generar fragmentos de queso desde el comienzo de la masticación.	Yogur natural desnatado "Larsa"	Cuajada "Asturiana"
Solubilidad	Capacidad de la muestra para fundirse con saliva.	Cuajada "Asturiana" (5)	
Humedad	Cantidad de agua absorbida o liberada por la muestra durante las primeras masticaciones.	Plátano	Yogur natural desnatado "Larsa"
Granulosidad	Percepción de partículas gruesas en la boca.	Requesón "Arquega" (5)	
Harinosidad	Percepción de textura harinosa en la boca.	Manzana Golden madura	Alubias en conserva con piel
Cremosidad	Percepción de cuerpo y suavidad presionando la muestra entre la lengua y el paladar.	Yogur natural desnatado "Larsa"	Queso crema "Philadelphia"
<b>Sabor y aroma</b>			
Sabor ácido	Sabor básico similar al de las soluciones acuosas diluidas de ácido cítrico.	0.13 g·L <sup>-1</sup> (5)	
Sabor salado	Sabor básico similar al de las soluciones acuosas diluidas de cloruro sódico.	0.70 g·L <sup>-1</sup> (5)	
Sabor amargo	Sabor básico similar al de las soluciones acuosas diluidas de cafeína.	0.54 g·L <sup>-1</sup> (5)	
Aroma a queso fresco	Intensidad de la sensación olfativo-gustativa percibida durante la masticación asociada con el aroma típico del queso fresco.	Queso comercial tipo Burgos (5)	
Aroma a leche	Intensidad de la sensación olfativo-gustativa percibida durante la masticación asociada con el aroma típico a leche a temperatura ambiente.	Ausencia	Leche entera
Aromas extraños	Aromas no típicos del queso fresco.	Ausencia	Intenso
Regusto	Intensidad de la sensación olfativo-gustativa percibida después de la masticación y la deglución de la muestra.	Ausencia	Intenso
Persistencia	Duración de la sensación olfativo-gustativa percibida después de que el bolo es deglutido.	≤10 seg	≥60 seg

### 10.3.2 Evaluación del panel

En análisis sensorial, un panel entrenado, está formado por varios catadores, que son utilizados como instrumento de medida para medir las características sensoriales (Bi and Kuesten, 2012), lo que implica una mayor complejidad para su calibración y monitorización, ya que el panel debe cumplir con los requisitos exigidos a cualquier instrumento de medida (Rosaria *et al.*, 2011). Por lo tanto, no se puede subestimar la importancia del calibrado del panel y es esencial tener un control de calidad de las medidas sensoriales antes de la evaluación

sensorial definitiva de los productos para garantizar la calidad de los resultados del análisis (Álvarez and Blanco, 2000).

Las investigaciones en el campo del análisis sensorial son unánimes en lo que se refiere a la necesidad de verificar el buen funcionamiento de los paneles y de los catadores entrenados, ya que la toma de decisiones decisivas acertadas para la industria alimentaria, dependen en gran medida de la calidad de los datos sensoriales. Sin embargo, existe una falta de un marco unificador en cuanto a los criterios a seguir y se detecta cierta confusión en las definiciones de los términos y criterios para verificar el buen funcionamiento de un panel entrenado (Bi and Kuesten, 2012).

En el presente estudio, el funcionamiento adecuado del panel se acreditará en base a los requisitos recogidos en la norma UNE-EN ISO 11132:2017 (2017). El panel debe tener una alta sensibilidad para detectar diferencias que pueden parecer pequeñas para los consumidores (sensibilidad/capacidad de discriminación). Cada miembro del panel debe puntuar con un buen grado de acuerdo con el resto del panel para una muestra dada (acuerdo/consistencia/reproducibilidad). Cada miembro del panel debe tener la capacidad de calificar el mismo producto de manera consistente para un atributo dado, es decir, calificar de manera similar los mismos estímulos (repetibilidad). Finalmente, los integrantes del panel deben usar la escala correctamente (Rossi, 2001; Latreille *et al.*, 2006; Etaio *et al.*, 2010; Rosaria *et al.*, 2011; Bi and Kuesten, 2012; ISO 8586, 2012; Sipos *et al.*, 2013; Peltier *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2014; Talsma, 2016).

Diferentes autores proponen varios métodos con el objetivo de monitorizar y evaluar el buen funcionamiento del panel, principalmente, utilizando los datos descriptivos para obtener el perfil sensorial. Varios autores hacen una revisión de la literatura (Rosaria *et al.*, 2011; Bi and Kuesten, 2012) y observan propuestas que incluyen métodos cualitativos y cuantitativos, métodos univariantes y multivariantes, métodos paramétricos y no paramétricos, métodos analíticos y gráficos, y métodos tradicionales y computacionales.

En el presente estudio, se valida el panel con 3 muestras, debido a que el panel tiene una amplia experiencia en productos lácteos (García-Gómez *et al.*, 2018, 2019c) y parte de estos catadores también han participado en la evaluación sensorial de otros alimentos, tales como productos cárnicos y vegetales (Arias-Carmona *et al.* 2012; Montouto-Graña *et al.* 2002; Ordóñez-Santos *et al.* 2009).

Debido al hecho de que se decide validar el panel con 3 muestras, se descarta el enfoque multivariante y se elige un enfoque univariante (ANOVA) de 3 factores (Tabla 10.2), método ampliamente utilizado en la literatura para monitorizar el panel en quesos y en otros productos (Bárceñas *et al.*, 2000; Carbonell *et al.*, 2002, 2007; Ares *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2015).



Tabla 10.2 Valores F de los diferentes descriptores tras aplicar un ANOVA de 3 factores (Catador, Producto y Sesión) con interacción. Se consideran los valores de significancia: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.001$ ).

Descriptor	Catador	Muestra	Sesión	Muestra:Catador	Muestra:Sesión	Catador:Sesión
Presencia de suero	8.25***	13.54***	3.38	0.95	1.29	2.13*
Friabilidad	3.04**	127.08***	0.02	2.66**	0.78	1.56
Solubilidad	3.03**	6.54**	24.47***	1.79	0.35	2.23*
Humedad	10.40***	1.40	0.773	1.30	1.78	1.05
Granulosidad	2.34*	1.82	1.4257	1.35	0.31	1.82
Harinosidad	6.70**	37.28***	0.08	1.87	3.69*	1.72
Cremosidad	2.23*	23.74***	82.04***	0.97	12.17***	3.28*
Sabor ácido	11.13***	0.63	0.53	0.65	0.47	1.10
Sabor salado	0.50	23.11**	1.28	0.99	3.69*	0.91
Sabor amargo	1.22	211.72***	1.50	1.80	0.05	1.73
Aroma a queso fresco	44.78***	33.00***	0.02	4.40***	0.28	1.86
Aroma a leche	7.16***	19.88***	4.91	1.29	0.75	0.83
Aromas extraños	0.8577	1.22	0.04	1.05	1.87	1.13
Regusto	10.55***	9.00***	0.99	1.18	0.45	2.05
Persistencia	26.61***	25.49***	5.44*	1.41	0.43	3.11**

### 10.3.2.1 Sensibilidad/capacidad de discriminación

El objetivo principal del análisis sensorial descriptivo, es discriminar entre muestras, en función de la intensidad de los atributos seleccionados para establecer el perfil sensorial (Carbonell *et al.*, 2007).

Un efecto significativo de la muestra indica que los catadores pueden discriminar entre productos. El panel puede discriminar entre los productos para 11 de los 15 descriptores (Tabla 10.2, columna 2). La falta de discriminación entre productos de acuerdo con la humedad, la granulosidad, el sabor ácido y los aromas extraños puede deberse a una falta de capacitación o a la similitud entre las muestras en esos descriptores (Sipos *et al.* 2013b).

Como se confirma a continuación, en el apartado 10.3.2.2 y 10.3.2.3, las evaluaciones de los catadores son consistentes en las diferentes sesiones y los productos son evaluados de manera similar en las diferentes sesiones para esos descriptores. Estos resultados sugieren que los descriptores en los que el p-valor no es significativo se debe a la similitud entre muestras en esos atributos.

Otro estudio sobre la fiabilidad de un panel entrenado en postres lácteos, obtiene un efecto significativo de la muestra en 3 de los 5 descriptores propuestos (Ares *et al.*, 2011).

### 10.3.2.2 Grado de acuerdo del panel/consistencia/reproductibilidad

La interacción muestra:catador no es significativa para la mayoría de los atributos evaluados, lo que indica una buena consistencia entre los panelistas (Tabla 10.2, columna 4). Una interacción significativa muestra:catador para la intensidad del aroma a queso fresco y para la friabilidad implica que no hay consenso entre los catadores para esos atributos, lo que representa una falta de consenso en el 13% de los descriptores evaluados. Se obtienen resultados similares en un panel de catadores expertos en mejillones frescos y cocidos donde se observa desacuerdo entre los catadores para el 13% de los descriptores evaluados (Oliveira *et al.*, 2015), mientras que el grado de acuerdo es escaso en el 17% de los descriptores en un panel entrenado en zumos de mandarina (Carbonell *et al.*, 2007).

Otros investigadores consideran que obtienen un buen grado de acuerdo del panel, aunque la interacción sea significativa en 4 de los 18 descriptores analizados (Sipos *et al.*, 2013). En otro estudio, utilizando un panel de expertos en margarina se obtienen diferentes resultados comparando diferentes protocolos de presentación de muestras, en cualquier caso, ninguno de los protocolos de presentación consigue un buen grado de acuerdo entre los catadores para los 6 descriptores evaluados (Györey *et al.*, 2012).

Similar a nuestros resultados, otros investigadores encuentran una interacción significativa muestra:catador en el descriptor friabilidad al evaluar a un panel entrenado en queso (Bárcenas *et al.*, 2000).

#### 10.3.2.3 Repetibilidad

Una interacción no significativa muestra:sesión (Tabla 10.2, columna 5) pone de manifiesto que cada muestra es evaluada de la misma manera en ambas sesiones. Únicamente, la harinosidad, la cremosidad y el sabor amargo son evaluados por el panel de manera significativamente diferente en las 2 sesiones. En general, los resultados sugieren una buena repetibilidad del panel.

Teniendo en cuenta la interacción catador:sesión (Tabla 10.2, columna 6), se puede estudiar la repetibilidad de cada catador. La interacción es significativa para 4 descriptores (presencia de suero, solubilidad, cremosidad y persistencia), lo que implica que uno o varios catadores, no evalúan igual los productos en las 2 sesiones. Este hecho no significa que el panel no sea repetible, ya que la repetibilidad del catador debe considerarse como relativa respecto a la repetibilidad del panel (Peltier *et al.*, 2014) y solo para uno de esos descriptores (cremosidad) las muestras se puntúan por el panel de ligeramente diferente en las 2 sesiones.

Otros investigadores observan una interacción significativa catador:sesión en la valoración de la cremosidad en un panel entrenado en postres lácteos (Ares *et al.*, 2011). Otros autores observan una repetibilidad cercana al 93% en un panel de mejillones frescos y cocidos (Oliveira *et al.*, 2015).

#### 10.3.2.4 Uso de la escala

El efecto catador es significativo para varios descriptores (Tabla 10.2, columna 1), lo que sugiere que la porción de la escala está siendo utilizada de diferente manera por los catadores. Este hecho es frecuente en análisis sensorial (Duran *et al.*, 2017) y en los estudios de queso en particular, ya que Bárcenas *et al.* (2000) observan un efecto significativo del catador en todos los descriptores. Otros autores obtienen resultados similares y señalan que esto se debe a que, a pesar de que los panelistas reciben entrenamiento para evaluar la intensidad de cada descriptor utilizando referencias, no usan la escala exactamente de la misma manera para evaluar las muestras (Carbonell *et al.*, 2002). Sin embargo, esto no afecta en gran medida a la interpretación de los resultados, ya que este efecto se elimina utilizando el modelo ANOVA (Lea *et al.*, 1997).

Además, cuando la interacción catador:muestra no es significativa para la mayoría de los descriptores, indica que el catador está de acuerdo con el resto de catadores en su calificación de la muestra (Lyon, 1980), y esto sucede para todos los atributos, excepto la friabilidad y la intensidad de aroma a queso fresco.

### 10.3.3 Perfil sensorial

El perfil sensorial obtenido para los quesos coagulados con los diferentes cuajos (animal, quimosina, vegetal y microbiano) sin añadir mTG se puede observar en la figura 10.2.

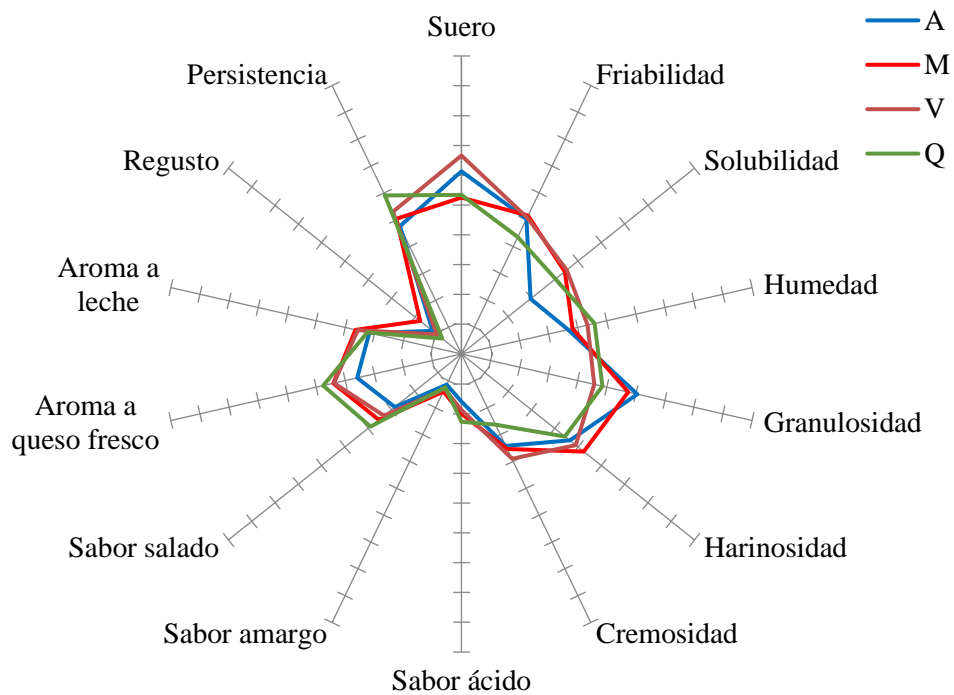


Figura 10.2. Perfil sensorial de los quesos coagulados con diferentes cuajos (A, cuajo de ternero; M, cuajo microbiano; V, cuajo vegetal y Q, quimosina). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

En la figura 10.3 se representa el perfil sensorial de los quesos obtenidos con los diferentes cuajos (animal, quimosina, vegetal y microbiano) y con adición de mTG.

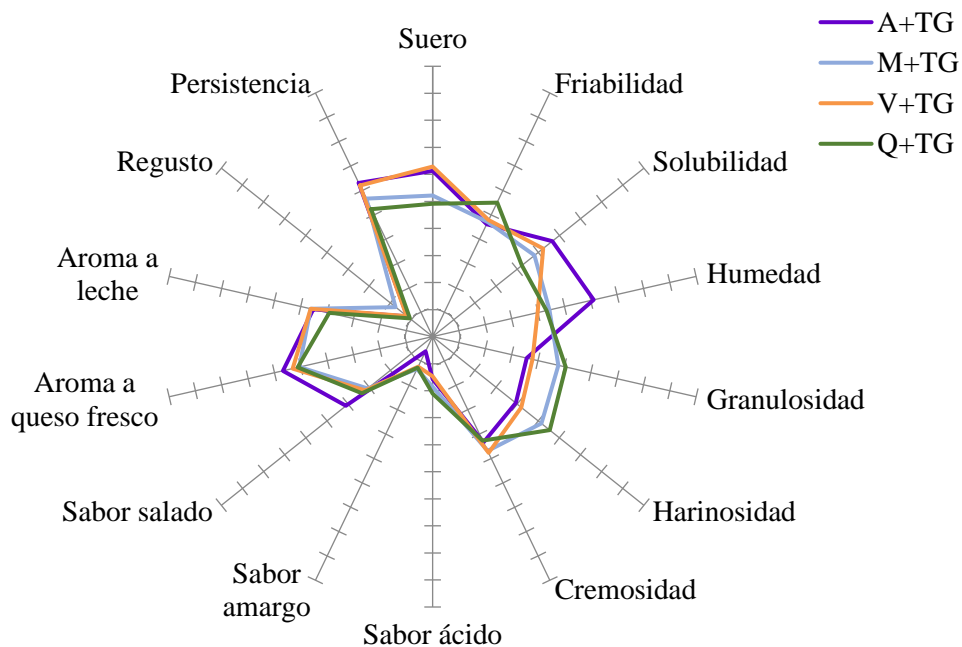


Figura 10.3. Perfil sensorial de los quesos coagulados con diferentes cuajos y mTG (A+TG, cuajo de ternero; M+TG, cuajo microbiano; V+TG, cuajo vegetal y Q+TG, quimosina). Niveles de significación: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  y \*\*\* $p < 0.0001$ .

Se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) para comparar el efecto del tipo de cuajo y el efecto de la adición de mTG. La interacción entre ambos factores no es significativa para ningún descriptor, excepto para la humedad ( $p < 0.01$ ) y para la persistencia ( $p < 0.01$ ).

#### 10.3.3.1 Efecto del tipo de cuajo

Los quesos coagulados con quimosina (Q) y los coagulados con cuajo microbiano (M) muestran puntuaciones iguales en cuanto al suero libre. Los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) son los que presentan una mayor cantidad de exudado de suero, con una puntuación de 6.7, aunque sin diferencias estadísticamente significativas con los quesos elaborados con los otros cuajos.

Con respecto a los descriptores de textura, en general, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, aunque se puede observar que el efecto del tipo de cuajo utilizado es más intenso en la solubilidad, en la granulosis y en la cremosidad. Los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) son los menos granulosos y los más cremosos.

Se encuentran resultados similares en un estudio que compara el efecto del tipo de cuajo (vegetal vs. animal) en los atributos sensoriales de quesos elaborados con leche de cabra, siendo los quesos coagulados con cuajo vegetal menos granulosos y más cremosos que los obtenidos con cuajo animal (Tejada and Cayuela, 2006). Igualmente, otros investigadores (García *et al.*, 2012) encuentran algunas diferencias al comparar las características de textura de los quesos en función del cuajo utilizado (vegetal, microbiano y animal), pero tampoco son estadísticamente significativas.

De la misma manera que en el presente estudio, en otras investigaciones se observan diferencias al estudiar el efecto de un coagulante vegetal en polvo en comparación con la quimosina en polvo sobre las características sensoriales de un queso de oveja, concluyendo que los quesos coagulados con cuajo vegetal son significativamente más cremosos que aquellos coagulados con cuajo animal (Galán *et al.*, 2012). Este efecto se atribuye al hecho de que los coagulantes de origen vegetal muestran una mayor actividad proteolítica, que provoca una mayor disrupción de la estructura proteica (García *et al.*, 2012) y, como consecuencia, se obtienen quesos más cremosos cuando se utilizan este tipo de coagulantes (Tejada *et al.*, 2007).

En cuanto a los sabores básicos (ácido, amargo y salado), los diferentes quesos son también muy similares entre sí. En otras investigaciones no se observan diferencias estadísticamente significativas en el sabor ácido o salado al comparar el efecto del coagulante vegetal, del coagulante microbiano y el coagulante de origen animal, ni en los quesos de leche de oveja ni en los de leche de cabra (Galán *et al.*, 2012; García *et al.*, 2012). A pesar de que, en el presente estudio, las diferencias en el sabor amargo son escasas, pequeñas diferencias en el amargor de un queso pueden ser decisivas para la aceptación del consumidor, ya que el amargor se percibe como un defecto en los quesos (Ritvanen *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden parcialmente con los obtenidos en un estudio realizado con queso de leche de oveja, en el que los resultados sensoriales indican que los quesos coagulados con cuajo microbiano reciben las puntuaciones de amargor más altas, mientras que los coagulados con cuajo de cardo recibieron las valoraciones más bajas en cuanto al amargor, recibiendo puntuaciones intermedias los quesos elaborados con cuajo de ternera (Samson *et al.*, 2004). Sin embargo, en otros estudios se concluye que los quesos coagulados con cuajos vegetales son significativamente más amargos que los coagulados con cuajo microbiano o de ternera (Tejada and Cayuela, 2006; García *et al.*, 2012).

Las puntuaciones del sabor amargo se correlacionan de manera significativa con la formación de péptidos responsables del sabor amargo, como consecuencia de una mayor proteólisis asociada al uso de coagulantes vegetales, siendo estos péptidos más frecuentes en

quesos de leche de vaca que en los quesos de leche de oveja (Galán *et al.*, 2012). En el presente estudio, a pesar de que los quesos se elaboran con leche de vaca, las diferencias respecto al amargor, entre los coagulantes seleccionados, fueron escasas, probablemente porque el efecto sensorial de los compuestos responsables del amargor en los quesos elaborados con leche entera es menor que cuando se elaboran con leche desnatada (Ritvanen *et al.*, 2005).

La intensidad de aroma a queso fresco se sitúa alrededor de los 4.8 puntos en el queso coagulado con quimosina, mientras que el queso coagulado con cuajo animal muestra la puntuación más baja obtenida en este descriptor (3.6 puntos).

En cuanto a la persistencia, son los quesos elaborados con quimosina y con cuajo animal los más y menos persistentes con 4.8 y 5.9 puntos, respectivamente.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas para ninguno de estos descriptores (intensidad del aroma y persistencia). Sin embargo, en otros estudios encuentran diferencias estadísticamente significativas en la intensidad del aroma del queso cuando un queso de oveja coagulado con cuajo de ternera se compara con otro elaborado con un cuajo vegetal de *Cynara cardunculus*, siendo la intensidad aromática del queso mayor en el queso coagulado con el cuajo vegetal (Galán *et al.*, 2012). Resultados similares también se observan en otros estudios (Prados and Pino, 2007). Sin embargo, Medina *et al.* (1992) concluyen que la intensidad del aroma del queso es independiente del tipo de cuajo, cuando se elabora queso hispánico y queso de Burgos con cuajo de ternera o con quimosina (Medina *et al.*, 1992).

#### 10.3.3.2 Efecto de la adición de mTG

La adición de mTG muestra un ligero efecto sobre el suero libre, observándose una disminución de menos de 0.5 puntos cuando se añade mTG.

Se obtienen resultados similares en un estudio en el que se mide el suero y la sinéresis en quesos con una dosis de mTG de  $0.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína, añadida antes del cuajo, en comparación con un control sin mTG. Sin embargo, se observa que el suero y la sinéresis son significativamente más bajos cuando se incorpora la mTG simultáneamente o después del coagulante (De Sá and Bordignon-Luiz, 2010).

Los parámetros de textura son los más afectados por la adición de mTG. Se observa un aumento significativo en la solubilidad ( $p < 0.05$ ) y en la cremosidad ( $p < 0.001$ ) como una tendencia global en todos los coagulantes, mientras que la granulosidad disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ). En general, el aumento de la solubilidad y de la cremosidad, así como la disminución de la granulosidad oscilan en un promedio de 1 punto. Las puntuaciones de la humedad aumentan significativamente con la adición de mTG, pero únicamente cuando el cuajo animal (A+TG) ( $p < 0.05$ ) y el cuajo microbiano ( $p < 0.01$ ) se usan como coagulantes, esto se debe a la interacción significativa ( $p < 0.05$ ) para estos descriptores.

En otro estudio, se concluye también que los quesos de leche de cabra son más cremosos cuando se añade mTG en comparación con un control sin mTG (Karzan *et al.*, 2016).

Por el contrario, en otro estudio en que se elabora un queso con leche de vaca pasteurizada, usando quimosina como coagulante y al que se añade mTG, se observa una disminución en la solubilidad a los 30 días de madurez en comparación con un control sin mTG. Esta disminución es mayor cuando la dosis de TG se incrementa de 0.1 a  $1.0 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína (Escobar *et al.*, 2014).

Ni la friabilidad ni la harinosidad se ven afectadas significativamente por la adición de mTG.

No se observa un efecto significativo de la adición de mTG ni sobre el sabor ácido, ni en el amargor, ni tampoco en el sabor salado. Sin embargo, tanto la intensidad del aroma a queso

fresco como la intensidad de aroma a leche son significativamente mayores cuando se incorpora la mTG en la elaboración del queso ( $p < 0.001$  y  $p < 0.01$ , respectivamente).

La persistencia también es significativamente mayor cuando se añade mTG. Este efecto depende del tipo de cuajo utilizado, observando esta tendencia al coagular los quesos con cuajo animal ( $p < 0.05$ ) y con cuajo vegetal ( $p < 0.01$ ).

Otros investigadores tampoco observan diferencias estadísticamente significativas en el amargor de un queso blando elaborado con leche de vaca pasteurizada, coagulados con cuajo animal y tratado con mTG ( $60 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$  de leche) en comparación con un control sin mTG (Mahmood and Sebo, 2009). Sin embargo, un queso elaborado con leche de cabra pasteurizada e incubado durante 1 hora con mTG (0, 4 y  $8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de proteína) es significativamente más amargo cuando se añade mTG a una dosis de  $8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$  de TG en comparación con un control sin mTG (Karzan *et al.*, 2016).

#### 10.3.3.3 Relación entre las medidas sensoriales e instrumentales de textura

Con fines comparativos, se realiza un análisis factorial múltiple (MFA) para determinar la relación entre las mediciones de textura sensoriales e instrumentales, estas últimas ya publicadas y descritas en el capítulo 9 (García-Gómez *et al.*, 2019d). Los resultados del MFA se muestran en la figura 10.4.



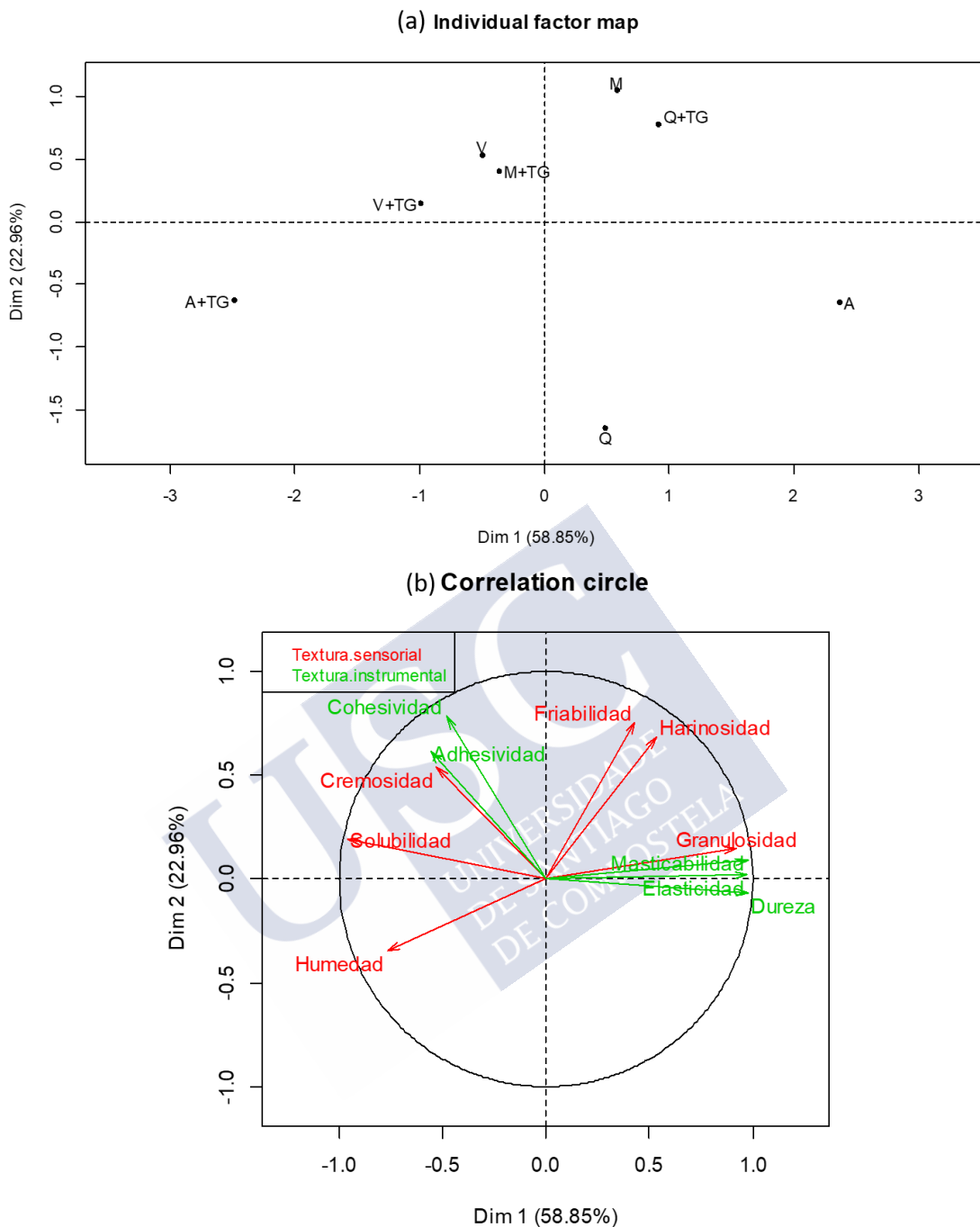


Figura 10.4. Análisis factorial múltiple (MFA) con los datos de textura obtenidas del análisis sensorial y del análisis instrumental.

Los quesos sin mTG (A, M y Q) se presentan como los más granulosos, más harinosos y más friables desde el punto de vista sensorial, mientras que a nivel instrumental destacan por mostrar una mayor masticabilidad, elasticidad y dureza. El queso coagulado con cuajo vegetal (V) muestra características más similares a los quesos a los que se añade la mTG, debido a que el queso coagulado con cuajo vegetal es más cremoso en comparación con los obtenidos con otros coagulantes.

En el lado opuesto, se posicionan los quesos tratados con mTG (A+TG, V+TG y M+TG) destacando por ser más cremosos y más solubles que el resto de los quesos desde el punto de

vista sensorial y mostrando una mayor cohesividad y adhesividad instrumental. El queso coagulado con quimosina y tratado con mTG (Q+TG) es similar a los no tratados, debido a su alta friabilidad y a una textura más harinosa en comparación con los otros en los que se ha agregado mTG.

Tanto desde el punto de vista sensorial como instrumental, el queso coagulado con cuajo animal es el más afectado por la adición de mTG a nivel de la textura.

La cremosidad muestra una correlación positiva con la solubilidad y negativa con la granulosidad medidas por los catadores. Otros investigadores también observan que la presencia de una textura granulosa disminuye la percepción de cremosidad en un queso crema (Frøst and Janhøj, 2007). La correlación de la cremosidad con las medidas instrumentales es positiva con la cohesividad y con la adhesividad. Estos resultados se confirman en otros estudios (Adhikari *et al.*, 2003; Konuklar *et al.*, 2004).

La granulosidad está positivamente correlacionada con las medidas instrumentales de masticabilidad, de elasticidad y de dureza. A su vez, estos parámetros instrumentales se correlacionan negativamente con la solubilidad, la cremosidad y la humedad. Estas observaciones están en la misma línea que los resultados de (Adhikari *et al.*, 2003) que identifica una correlación positiva entre la dureza y la granulosidad en quesos comerciales.

#### **10.4 CONCLUSIONES**

- En general, los quesos con mTG son menos granuloso, más solubles, más cremosos y con una mayor intensidad de aroma a leche y a queso fresco.
- El efecto de la mTG sobre la humedad y la persistencia es diferente en función del tipo de cuajo utilizado. Así, se produce un incremento en la humedad al incorporar la mTG en los quesos coagulados con cuajo animal y con cuajo microbiano, mientras que la persistencia aumenta cuando se añade mTG a los quesos elaborados con cuajo animal y vegetal.
- Se observa una correlación positiva entre cremosidad sensorial y la cohesividad y la adhesividad instrumental.
- La granulosidad sensorial se correlaciona positivamente con la masticabilidad, la elasticidad y la dureza instrumental, que a su vez se correlacionan negativamente con la solubilidad, con la cremosidad y con la humedad sensorial.
- Tanto el análisis sensorial como el instrumental muestran que el efecto de la mTG es mayor en el queso coagulado con cuajo animal.

#### **10.5 AGRADECIMIENTOS**

Se agradece el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (España) para este trabajo (proyecto RTC2014-1835-2).

#### **10.6 BIBLIOGRAFÍA**

Adhikari, K., Heymann, H. & Huff, H.E. (2003). Textural characteristics of lowfat, fullfat and smoked cheeses: Sensory and instrumental approaches. *Food Quality and Preference*, 14, 211-218.

Akbar, A., Sadiq, M.B., Ali, I., Anwar, M., Muhammad, N., Muhammad, J., Shafee, M., Ullah, S., Gul, Z., Qasim, S., Ahmad, S. & Anal, A.K. (2019). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from fermented milk products and its antimicrobial potential. *CyTA-Journal of Food*, 17, 214-220.



- Almeida, C.M. & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4675-4686.
- Álvarez, P. & Blanco, M.A. (2000). Reliability of the sensory analysis data of a panel of tasters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 409-418.
- Alves, L.S., Gomes, E., Silva, R. & Gigante, M.L. (2015). Yield, changes in proteolysis, and sensory quality of Prato cheese produced with different coagulants. *Journal of Dairy Science*, 96, 7490-7499.
- Amerine, M.A., Pangborn, R.M. & Roessler, E.B. (1965). Principles of sensory evaluation of food. Ed. Academic Press. Londres.
- 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.
- Aprodu, I., Gurau, G., Ionescu, A. & Banu, I. (2011). The effect of transglutaminase on the rheological properties of yogurt. *Scientific Study and Research: Chemistry and Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 12, 185-196.
- Ares, G., Bruzzone, F. & Giménez, A. (2011). Is a consumer panel able to reliably evaluate the texture of dairy desserts using unstructured intensity scales?. Evaluation of global and individual performance. *Journal of Sensory Studies*, 26, 363-370.
- Arias-Carmona, M.D., Romero-Rodríguez, M.A., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez-Odériz, M.L. (2012). Sensory Analysis of Protected Geographical Indication Products: An Example with Turnip Greens and Tops. *Journal of Sensory Studies*, 27, 482-489.
- Bárcenas, P., Elortondo, F. P., & Albisu, M. (2000). Selection and screening of a descriptive panel for ewes milk cheese sensory profiling. *Journal of Sensory Studies*, 15, 79-99.
- Bárcenas, P., Pérez Elortondo, F.J. & Albisu, M. (2004). Projective mapping in sensory analysis of ewes milk cheeses: A study on consumers and trained panel performance. *Food Research International*, 37, 723-729.
- Bi, J. & Kuesten, C. (2012). Intraclass Correlation Coefficient (ICC): A Framework for Monitoring and Assessing Performance of Trained Sensory Panels and Panelists. *Journal of Sensory Studies*, 27, 352-364.
- Bönisch, M.P., Heidebach, T.C. & Kulozik, U. (2008). Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. *Food Hydrocolloids*, 22, 288-297.
- Carbonell, L., Izquierdo, L. & Carbonell, I. (2007). Sensory analysis of Spanish mandarin juices. Selection of attributes and panel performance. *Food Quality and Preference*, 18, 329-341.
- Carbonell, L., Izquierdo, L. & Costell, E. (2002). Sensory Profiling of Cooked Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*): Sensory Evaluation Procedures and Panel Training. *Food Science and Technology International*, 8, 169-177.
- DeJong, G.A.H. & Koppelman, S.J. (2002). Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications. *Journal of Food Science*, 67, 2798-2806.
- De Mendiburu, F. (2017). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-8.

- 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.
- Duran A., N., Hoppenreys, M. & Kermarrec, C. (2017). Evaluation of the performances of the panel. Disponible en: [http://sensominer.free.fr/studies/duran\\_hoppenreys\\_kermarrec.doc](http://sensominer.free.fr/studies/duran_hoppenreys_kermarrec.doc).
- Escobar, D., Arcia, P., Curutchet, A., Pelaggio, R., Urrestarazu, P. & Márquez Romero, R. (2014). Influencia de la transglutaminasa en el rendimiento de la producción de queso Dambo uruguayo. *Innotec*, 9, 24-30.
- Etaio, I., Albisu, M., Ojeda, M., Gil, P.F., Salmerón, J. & Pérez Elortondo, F.J. (2010). Sensory quality control for food certification: A case study on wine. Panel training and qualification, method validation and monitoring. *Food Control*, 21, 542-548.
- Etaio, I., Gil, P.F., Ojeda, M., Albisu, M., Salmerón, J. & Elortondo, F.J.P. (2013). Evaluation of sensory quality of calf chops: A new methodological approach. *Meat Science*, 94, 105-114.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. & McSweeney, P.L. (2016). *Fundamentals of cheese science*. Ed Springer. Nueva York. ISBN 978-0-8342-1260-2.
- Frøst, M.B. & Janhøj, T. (2007). Understanding creaminess. *International Dairy Journal*, 17, 1298-1311.
- Galán, E., Cabezas, L. & Fernández-Salguero, J. (2012). Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal*, 25, 92-96.
- García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, A. & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.
- García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, A. & Vázquez, M. (2019a). Sensory evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2088-2095.
- García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, A. & Vázquez, M. (2019b). Skim yoghurt with microbial transglutaminase: evaluation of consumer acceptance. *CyTA-Journal of Food*, 17, 280-287.
- García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, A. & Vázquez, M. (2019c). Sensory quality and consumer acceptance of skim yoghurt produced with transglutaminase at pilot plant scale. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 388-394.
- García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, A. & Vázquez, M. (2019d). Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh cheese production: Effect on physicochemical and textural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 113, 108279.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoial, K., Rodríguez, J., Roa, I. & López, M.B. (2012). Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science and Technology*, 92, 691-707.

- Granados-Rivera, L.D., Hernández-Mendo, O., Burgueño-Ferreira, J.A., González-Muñoz, S.S., Mendoza-Martínez, G.D., Mora-Flores, J.S. & Arriaga-Jordán, C.M. (2018). Mexican tropical cream cheese yield using low-fat milk induced by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid: Effect of palmitic acid. *CyTA-Journal of Food*, 16, 311-315.
- Györey, A., Gere, A., Kókai, Z., Molnár, P. & Sipos, L. (2012). Effect of sample presentation protocols on the performance of a margarine expert panel. *Acta Alimentaria*, 41, 62-72.
- Jaros, D., Jaros, D., Partschefeld, C., Partschefeld, C., Henle, T., Henle, T., Rohm, H. & Rohm, H. (2006). Transglutaminase in dairy products: Chemistry, physics, applications. *Journal of Texture Studies*, 37, 113-155.
- Karzan, T.M., Nawal, H.S. & Ashna, T.A. (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.
- King, M.C., Hall, J. & Cliff, M.A. (2001). A Comparison of Methods for Evaluating the Performance of a Trained Sensory Panel. *Journal of Sensory Studies*, 16, 567-581.
- Kiss, A., Naár, Z., Daróczy, L., Kukovics, S., Kukovics, F., Mirmazloum, I. & Némedi, E. (2019). Changes of free fatty acid composition and number of lactic acid bacteria in three functional goat and sheep milk products fortified with inulin or fish oil. *CyTA-Journal of Food*, 17, 51-59.
- Konuklar, G., Inglett, G.E., Warner, K. & Carriere, C.J. (2004). Use of a  $\beta$ -glucan hydrocolloidal suspension in the manufacture of low-fat Cheddar cheeses: Textural properties by instrumental methods and sensory panels. *Food Hydrocolloids*, 18, 535-545.
- Latreille, J., Mauger, E., Ambroisine, L., Tenenhaus, M., Vincent, M., Navarro, S. & Guinot, C. (2006). Measurement of the reliability of sensory panel performances. *Food Quality and Preference*, 17, 369-375.
- Lê, S., Josse, J. & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Software, Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical*, 25, 1-18.
- Lea, P., Næs, T. & Rødbotten, M. (1997). *Analysis of Variance for Sensory Data*. Chichester: Editorial John Wiley & Sons, Inc.
- Lorenzen, P.C., Neve, H., Mautner, A. & Schlimme, E. (2002). Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 152-157.
- Lyon, B.G. (1980). Sensory Profiling of Canned Boned Chicken: Sensory Evaluation Procedures and Data Analysis. *Journal of Food Science*, 45, 1341-1346.
- Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2009). Effect of microbial transglutaminase treatment on soft cheese properties. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 37, 19-27.
- 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.
- Medina, M., Gaya, P. & Nu, M. (1992). Characteristics of Burgos and Hispánico cheeses manufactured with calf rennet or with recombinant chymosin. *Food chemistry*, 45, 85-89.
- Meilgaard, M.C., Carr, B.T., & Civille, G.V. (2016). *Sensory Evaluation Techniques*. 5<sup>th</sup> edition. Ed. CRC Press. Nueva York. ISBN 978-1-4822-1691-2.

- Montouto-Graña, M., Fernández-Fernández, E., Vázquez-Odériz, M.L. & Romero-Rodríguez, M.A. (2002). Development of a sensory profile for the specific denomination “Galician potato”. *Food Quality and Preference*, 13, 99-106.
- O’Sullivan, M.M., Kelly, A.L. & Fox, P.F. (2002). Effect of transglutaminase on the heat stability of milk: A possible mechanism. *Journal of Dairy Science*, 85, 1-7.
- Oliveira, A.R., Sykes, A. V., Hachero-Cruzado, I., Azeiteiro, U.M. & Esteves, E. (2015). A sensory and nutritional comparison of mussels (*Mytilus sp.*) produced in NW Iberia and in the Armona offshore production area (Algarve, Portugal). *Food Chemistry*, 168, 520-528.
- Ordóñez-Santos, L.E., Arbones-Macínheira, E., Fernández-Perejón, J., Lombardero-Fernández, M., Vázquez-Odériz, L. & Romero-Rodríguez, A. (2009). Comparison of physicochemical, microscopic and sensory characteristics of ecologically and conventionally grown crops of two cultivars of tomato (*Lycopersicon esculentum mill.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 743-749.
- Özer, B., Avni Kirmaci, H., Oztekin, S., Hayaloglu, A. & Atamer, M. (2007). Incorporation of microbial transglutaminase into non-fat yogurt production. *International Dairy Journal*, 17, 199-207.
- Özer, 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.
- Özrenk, E. (2006). The use of transglutaminase in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 1-7.
- Peltier, C., Brockhoff, P.B., Visalli, M. & Schlich, P. (2014). The MAM-CAP table : A new tool for monitoring panel performances. *Food Quality and Preference*, 32, 24-27.
- Pereira, J.A., Dionísio, L., Matos, T.J.S. & Patarata, L. (2015). Sensory Lexicon Development for a Portuguese Cooked Blood Sausage - Morcela deArroz deMonchique - to Predict Its Usefulness for a Geographical Certification. *Journal of Sensory Studies*, 30, 56-67.
- Pinto, F.S.T., Fogliatto, F.S. & Qannari, E.M. (2014). A method for panelists’ consistency assessment in sensory evaluations based on the Cronbach’ s alpha coefficient. *Food Quality and Preference*, 32, 41-47.
- Portilla-Rivera, O.M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez de León, J.A. & Vázquez, M. (2009). Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 19-26.
- Prados, F. & Pino, A. (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.
- Prados, F., Pino, A., Tejada, L., Ferna, J. & Gala, E. (2008). Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk, 18, 93-98.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.
- Ritvanen, T., Lampolahti, S., Lilleberg, L., Tupasela, T., Isoniemi, M., Appelbye, U., Lyytikäinen, T., Eerola, S. & Uusi-Rauva, E. (2005). Sensory evaluation, chemical composition

and consumer acceptance of full fat and reduced fat cheeses in the Finnish market. *Food Quality and Preference*, 16, 479-492.

Romeih, E. & Walker, G. (2017). Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 133-140.

Rosaria, R., Vestergaard, J.S., Kompany-Zareh, M. & Bredie, W.L. (2011). Monitoring Panel Performance Within and Between Sensory Experiments by Multi-Way Analysis. En: *Classification and Multivariate Analysis for Complex Data Structures* (editado por: Fichet, B. Piccolo, B., Verde, D. R. & Vichi, M.). Pag. 335-342. Ed. Springer. Berlin. ISBN 978-3-642-13311-4

Rossi, F. (2001). Assessing sensory panelist performance using repeatability and reproducibility measures. *Food Quality and Preference*, 12, 467-479.

Russell, B.C.A., Mcalister, G.A., Ross, I.S.B. & Pethick, D.W.C. (2005). Lamb and sheep meat eating quality-industry and scientific issues and the need for integrated research. *Australian Journal of Experimental*, 45, 465-467.

De Sá, E.M.F. & Bordignon-Luiz, M.T. (2010). The effect of transglutaminase on the properties of milk gels and processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63, 243-251.

Sahmer, K. & Qannari, E.M. (2008). Procedures for the selection of a subset of attributes in sensory profiling. *Food Quality and Preference*, 19, 141-145.

Samson, A., Shaojiang, C. & Zhao, J. (2004). Formation of bitter peptides during ripening of ovine milk cheese made with different coagulants. *Le Lait*, INRA Editions, 84, 567-578.

Şanlı, T., Sezgin, E., Devenci, 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.

Selin, A., Demet, E., Çağım, A.Ç., Hasan, V., Asliye, K. & Mehmet, K. (2018). Effect of *Oryctolagus cuniculus* (rabbit) rennet on the texture, rheology, and sensory properties of white cheese. *Food Science & Nutrition*, 6, 1100-1108.

Sipos, L., Gere, A., Szöllosi, D., Kovács, Z., Kókai, Z. & Fekete, A. (2013). Sensory evaluation and electronic tongue for sensing flavored mineral water taste attributes. *Journal of Food Science*, 78, S1602-S1608.

Talsma, P. (2016). Assessing sensory panel performance using generalizability theory. *Food Quality and Preference*, 47, 3-9.

Tejada, L. & Cayuela, J.M. (2006). Sensorial Characteristics During Ripening of the the Type of Coagulant Used and the Size of the Cheese. *Journal of Sensory Studies*, 21, 333-347.

Tejada, L., Gómez, R. & Fernández-Salguero, J. (2007). Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: Calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Quality*, 30, 91-103.

Tsevdou, M.S., Eleftheriou, E.G. & Taoukis, P.S. (2013). Transglutaminase treatment of thermally and high pressure processed milk: Effects on the properties and storage stability of set yoghurt. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 17, 144-152.

UNE-EN ISO 8586:2014/Amd.:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y control de catadores y catadores expertos. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.

- UNE-EN ISO 8589:2010/Amd.1:2014. (2014). Análisis sensorial. Guía general para el diseño de una sala de cata. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE-EN ISO 11132:2017. (2017). Análisis sensorial. Metodología. Guía para la supervisión del desempeño de un panel sensorial cuantitativo. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- UNE 87027:2018. (2018). Análisis sensorial. Identificación y selección de descriptores para la elaboración de un perfil sensorial mediante diferentes enfoques. Ed. Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR), Madrid.
- Uresti, R.M., López-Arias, N., González-Cabriaes, J.J., Ramírez, J.A. & Vázquez, M. (2003a). Use of amidated low methoxyl pectin to produce fish restructured products. *Food Hydrocolloids*, 17, 171-176.
- Uresti, R.M., Ramírez, J.A., López-Arias, N. & Vázquez, M. (2003b). Negative effect of combining microbial transglutaminase with low methoxyl pectins on the mechanical properties and colour attributes of fish gels. *Food Chemistry*, 80, 551-556.
- Vázquez-Velázquez, R., Salvador-Figueroa, M., Adriano-Anaya, L., DeGyves-Córdova, G. & Vázquez-Ovando, A. (2018). Use of starter culture of native lactic acid bacteria for producing an artisanal Mexican cheese safe and sensory acceptable. *CyTA-Journal of Food*, 16, 460-468.
- Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).
- Wróblewska, B., Kaliszewska, A., Kołakowski, P., Pawlikowska, K. & Troszyńska, A. (2011). Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 215-227.
- Yokoyama, K., Nio, N. & Kikuchi, Y. (2004). Properties and applications of microbial transglutaminase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 447-454.
- Yüksel, Z., Avci, E. & Erdem, Y.K. (2011). Modification of the renneting process in Berridge substrate by transglutaminase. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 365-371.



## 11. EFECTO DEL TIPO DE CUAJO Y DE LA TRANSGLUTAMINASA MICROBIANA SOBRE LA ACEPTACIÓN POR PARTE DEL CONSUMIDOR DEL QUESO FRESCO Y EVALUACIÓN DE SUS CARACTERÍSTICAS A LO LARGO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

### Resumen

Una vez conocida la influencia de la utilización de los diferentes tipos de cuajo y de la adición de la transglutaminasa microbiana (mTG) sobre las características físico-químicas y sensoriales del queso fresco, se plantea este estudio para conocer la opinión del consumidor.

Además, se pretende conocer los cambios que se producen a nivel sensorial y físico-químico durante el tiempo de almacenamiento para establecer el fin de la vida útil.

Para ello, se elabora, y analiza, queso fresco “tipo Burgos” coagulado con cuajo animal y vegetal con mTG, utilizando las mismas condiciones que las descritas en los capítulos 9 y 10.

El queso coagulado con cuajo vegetal y mTG (V+TG) es el que presenta una mayor aceptación por parte del consumidor caracterizándose por una cierta friabilidad y dureza y por no ser cremoso.

Por tanto, se selecciona este queso para estudiar los posibles cambios a lo largo del tiempo de almacenamiento y se compara con el queso elaborado con el mismo cuajo vegetal, pero sin adición de mTG.

Los parámetros con una mayor correlación positiva con el tiempo de almacenamiento son el sabor amargo, la  $A_w$ , la persistencia, los aromas extraños, el sabor ácido y el regusto.

La mTG no afecta en gran medida a la evolución en el tiempo del queso fresco.

**Palabras Clave:** transglutaminasa; queso; consumidores; aceptación; preferencia; almacenamiento.



## 11.1 INTRODUCCIÓN

Se espera que la producción mundial de queso alcance los 25.075 millones de t en 2020 (PM Food & Dairy Consulting, 2014) y el consumo de queso *per cápita* crezca a una tasa anual de 0.9% hasta 2026 (OCDE/FAO, 2017).

Mejorar la calidad y la funcionalidad de los productos lácteos es de suma importancia para que los consumidores muestren una mayor aceptación hacia los productos en un mercado altamente competitivo.

Una de las estrategias más novedosas para mejorar las características de estos productos es la formación de polímeros de alto peso molecular mediante reticulación con transglutaminasa microbiana (mTG). La reacción se produce entre dos residuos de aminoácidos (glutamilo y lisilo) disponibles en la estructura de las proteínas de la leche. La adición de mTG al queso conlleva la formación de enlaces cruzados covalentes intra- e intermoleculares que mejoran la humedad, el rendimiento, la textura y las propiedades sensoriales, sin cambios en su composición (Özrenk, 2006; Gaspar y De Góes-Favoni, 2015; Gharibzahedi *et al.*, 2018).

Otras características que hacen atractivo para la industria el uso de la mTG es la ausencia de toxicidad, su biodegradabilidad y que es funcionalmente operable en las condiciones habituales de operación en la industria alimentaria. Estas ventajas han llevado a su implementación en la industria alimentaria para elaborar productos con un valor añadido (Fatima y Khare, 2018).

Hay 3 vías de aplicación de la mTG en la producción del queso (Romeih and Walker, 2017): i) puede incubarse la leche con la mTG antes de añadir el coagulante, por lo que requiere una etapa de inactivación térmica de la enzima, que puede llevarse a cabo con la pasteurización; ii) puede añadirse la mTG simultáneamente con el coagulante y, iii) puede añadirse la mTG después del corte de la cuajada, o antes de finalizar la floculación.

Los resultados de algunas investigaciones sugieren que la reticulación enzimática de las micelas de caseína con mTG parece tener una influencia adversa en la coagulación inducida por el cuajo, ya que una incubación previa a la adición de cuajo con mTG a 30°C reduce progresivamente los niveles de caseínas monoméricas y aumenta el tiempo de floculación del cuajo.

La inhibición inducida por la mTG de la coagulación inducida por el cuajo de las micelas de caseína se debe principalmente a una inhibición de la fase secundaria de la coagulación (Huppertz y de Kruif, 2007), pero también afecta a la primera fase (Yüksel *et al.*, 2011; Özer *et al.*, 2012).

Los tiempos de coagulación pueden alargarse, sobre todo, cuando la mTG se añade antes del coagulante, pero esto puede evitarse añadiendo la mTG al mismo tiempo que el coagulante (Domagała *et al.*, 2015). Añadir la mTG después del corte de la cuajada, o antes de finalizar la floculación interfiere en menor medida en la coagulación (Yüksel *et al.*, 2011).

La adición de mTG puede usarse como herramienta para modificar las características de los quesos blandos o semiduros (Bönisch *et al.*, 2008; Özer *et al.*, 2012), ya que en quesos duros retarda los tiempos de coagulación y el proceso de maduración (Romeih and Walker, 2017).

El queso de Burgos es un queso fresco muy conocido y apreciado en España desde la antigüedad. La elaboración tradicional del queso de Burgos es con leche de oveja, aunque actualmente se produce principalmente con leche de vaca o mezclas de leche de vaca y oveja. El queso de Burgos generalmente se prepara con leche pasteurizada, sales de calcio y cuajo de ternera para obtener una cuajada compacta en media hora aproximadamente. La cuajada se corta en trozos cuadrados y se deja reposar y decantar. La cuajada se coloca en moldes con forma cilíndrica perforados y se deja escurrir durante unas horas, una vez que desuera y coge forma, está listo para su consumo (Hernando y Lluch, 2000). Al igual que con otros quesos

frescos, no se añade ningún cultivo iniciador o se añade en muy poca cantidad (Zamora *et al.*, 2012).

Hoy en día, el cuajo de ternera sigue siendo uno de los principales coagulantes usados en la producción quesera, aunque varios factores como la reducción de disponibilidad, el precio y las demandas de segmentos de consumidores con requerimientos específicos (por ejemplo, lactovegetarianos), hacen necesaria la búsqueda de alternativas para el cuajo animal.

Los coagulantes derivados de plantas son una de las alternativas (Jaros y Rohm, 2017). Así, los extractos acuosos crudos de las flores de *Cynara cardunculus* se usan como coagulantes en la producción de quesos de oveja y cabra desde la antigüedad en diferentes variedades de queso español y portugués, pero hasta que no se consigue su purificación y estandarización no han sido una alternativa competitiva frente al cuajo animal para su aplicación a nivel industrial (Almeida and Simões, 2018).

Los quesos se consumen por su alto valor nutricional y por su calidad sensorial (Drake y Delahunty, 2017). Las características sensoriales del queso son las propiedades percibidas por los sentidos humanos, predominantemente durante el consumo. Estas propiedades pueden describirse como características de apariencia, sabor, aroma y textura (Bodyfelt *et al.*, 2008). Por lo tanto, para producir queso de alta calidad se requiere un control preciso de los factores que determinan las propiedades sensoriales del producto (Foegeding *et al.*, 2003).

La calidad sensorial es la medida definitiva de la calidad del producto y determina el éxito en el mercado (Drake, 2007). Los parámetros sensoriales que constituyen la calidad sensorial no pueden medirse adecuadamente únicamente por medios químicos, físicos o microbiológicos (Bodyfelt *et al.*, 2008).

Las pruebas sensoriales se pueden dividir en dos categorías: afectivas y analíticas (Foegeding *et al.*, 2003). Las pruebas afectivas o hedónicas se refieren a la percepción subjetiva del producto por parte de los consumidores, que van a evaluar la aceptación y/o la preferencia. Por otro lado, las pruebas analíticas, realizadas con paneles de catadores entrenados, permiten describir y diferenciar objetivamente productos en función de varios descriptores sensoriales.

Los catadores requieren un entrenamiento previo para poder realizar la evaluación sensorial de queso y poder emplear técnicas complejas en análisis sensorial, como es el Análisis Descriptivo cuantitativo (QDA). Establecer definiciones claras y referencias para los atributos a evaluar por el panel entrenado facilita la comparación de resultados con otros estudios.

Es fundamental analizar los datos obtenidos tras la aplicación de las técnicas sensoriales mediante tratamientos estadísticos adecuados. (Bodyfelt *et al.*, 2008).

Además, se pueden establecer relaciones entre los datos obtenidos con el panel de catadores entrenado (objetivos) y los obtenidos con los consumidores (subjetivos), lo que constituye una herramienta poderosa para la investigación de productos y mercados que a menudo requieren información más detallada y compleja sobre las propiedades sensoriales de los alimentos y de como las valora el consumidor (Drake, 2007).

No hay conocimiento sobre estudios que comparen el efecto de diferentes coagulantes combinados con la mTG en la elaboración de queso sobre la aceptación de los consumidores. Tampoco se tiene conocimiento de estudios que analicen la evolución de los quesos frescos elaborados con mTG combinada con diferentes tipos de coagulantes a lo largo del periodo de almacenamiento. Si hay estudios, para evaluar el efecto combinado de la incubación previa con mTG combinada con diferentes cuajos desde un punto de vista físico-químico y de la textura instrumental (capítulo 9) (García-Gómez *et al.*, 2019a) y también desde un punto de vista sensorial (capítulo 10).

Antes de recomendar la mTG para aplicaciones comerciales en la fabricación de queso, es necesario conocer la percepción de los consumidores, además de disponer de los datos de los

análisis físico-químicos, de textura instrumental y de la caracterización sensorial por un panel de catadores entrenados (Özer *et al.*, 2013).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es identificar las características sensoriales que afectan o determinan la aceptación y preferencia del consumidor de un queso fresco “tipo Burgos”, coagulado con cuajo animal o cuajo vegetal combinado con mTG incorporada previamente la adición de cuajo. También se pretende determinar la evolución del queso con más aceptación durante el almacenamiento, estudiando los cambios que se produzcan desde un punto de vista físico-químico y sensorial.

## 11.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 11.2.1 Materias primas

Los quesos se elaboran a partir de leche de vaca comercial entera pasteurizada (3.1% % de proteína, 3.6% de grasa y 3.6% de extracto seco) y se utilizan 2 coagulantes comerciales: cuajo animal de ternero (actividad coagulante: 180 UC·g<sup>-1</sup>, 95±5%, quimosina y pepsina ≤5%) y cuajo vegetal de *Cynara cardunculus*. Todos los coagulantes son suministrados por Abiasa (Tui, Pontevedra, España).

La mTG es producida en nuestro laboratorio, siguiendo el proceso de fabricación descrito en la patente española ES-2376439 (Vázquez and Guerra-Rodríguez, 2012). Previamente a su aplicación se mide la actividad de la mTG mediante un procedimiento de espectrofotometría (Portilla-Rivera *et al.*, 2009). La actividad medida previamente a su uso es de 470 U·g<sup>-1</sup>. Utilizando el mismo método se determina si hay actividad residual de la mTG en los quesos.

### 11.2.2 Elaboración del queso

Los quesos se elaboran como se describe en García-Gómez *et al.* (2019a) (capítulo 9, apartado 9.2.2). A continuación, las muestras de queso se desmoldan y se almacenan en refrigeración a 4°C al menos 24 h antes de ser analizadas.

Las muestras se analizan en diferentes puntos de control (0, 7 y 14 días) durante el periodo de almacenamiento, en función de los parámetros físico-químicos y sensoriales evaluados por un panel de catadores entrenados. Las evaluaciones con el panel de consumidores se llevan a cabo el “día 0” de almacenamiento.

### 11.2.3 Evaluación hedónica con consumidores

El test con consumidores, incluye a 100 consumidores habituales de queso fresco tipo Burgos. Los consumidores se reclutan en Lugo y realizan la evaluación en la sala de cata (el test de laboratorio). Los consumidores evalúan las muestras en cabinas individuales iluminadas con luz blanca.

A los consumidores se les presenta una porción de cada muestra en un plato blanco. Cada muestra de queso (porción de 2 x 5 cm) se codifica con números aleatorios de 3 dígitos, y se sigue una presentación monádica secuencial utilizando un diseño de bloques completos (Souza *et al.*, 2019).

Los consumidores califican cada muestra de acuerdo con la aceptación de la apariencia, el olor, el sabor, la textura y la aceptabilidad general (Majchrzak *et al.* 2010). Para calificar la aceptación, los consumidores utilizan una escala hedónica estructurada de 9 puntos, que va de 1 a 9 (1-me disgusta muchísimo, 2-me disgusta mucho, 3-me disgusta, 4-me disgusta ligeramente, 5-ni me gusta ni me disgusta, 6-me gusta ligeramente, 7-me gusta, 8-me gusta mucho y 9-me gusta muchísimo) (Ramírez-Rivera *et al.*, 2018). Además, los consumidores clasifican las 4 muestras de quesos en función del orden de preferencia.

También se pregunta a los consumidores sobre su disposición a consumirlo o si descartarían totalmente alguna muestra para su consumo y sobre los motivos para elegir o descartar las muestras.

Los participantes son entrevistados sobre hábitos de compra, frecuencia y motivación para el consumo de queso fresco tipo Burgos. También se recopilan datos sociodemográficos.

Se descarta a uno de los consumidores, por no completar totalmente las cuestiones planteadas.

De los encuestados un 69.7% son mujeres y un 30.3% hombres. En función de la edad, un 54.5% tienen 18 y 39 años, un 28.3% 40-59 años y un 17.2% más de 60 años.

No se proporciona información sobre las muestras a los consumidores y no recibieron ningún incentivo monetario por su participación para evitar sesgos.

#### **11.2.4 Evaluación sensorial descriptiva cuantitativa**

El análisis descriptivo cuantitativo se lleva a cabo con un panel entrenado formado por 15 catadores con experiencia previa en la evaluación sensorial del queso. Los descriptores sensoriales y las referencias utilizadas para evaluar los quesos son los mismos que se recogen en el capítulo 10 (apartado 10.2.4).

#### **11.2.5 Análisis instrumental de la textura**

El procedimiento para las medidas instrumentales de textura se describe en García-Gómez *et al.* (2019a) (capítulo 9, apartado 9.2.3).

#### **11.2.6 Análisis estadístico**

El test no paramétrico de Friedman permite detectar posibles diferencias entre las puntuaciones de aceptación para las diferentes muestras de queso. El test no paramétrico de suma de rangos análogo al test de LSD de Fisher se aplica para estudiar las diferencias entre las muestras de queso 2 a 2.

El test de rangos de Spearman se aplica para identificar los atributos hedónicos con una mayor correlación con la aceptación global.

Se utiliza el test de independencia Chi-Cuadrado de Pearson para estudiar si la aceptación global y la preferencia son independientes del género y la edad de los encuestados. En aquellos casos en los que más de un 20% de casos tienen una frecuencia inferior a 5 se aplica el test exacto de Fisher.

Para evaluar las diferencias entre los parámetros físico-químicos y sensoriales de las muestras durante el almacenamiento, se realiza un análisis de varianza (ANOVA) de 2 factores con interacción. Los factores son tiempo (día 0, día 7 y día 14) y la adición de mTG (sí, no). Cuando la interacción de los factores es estadísticamente significativa para algún parámetro, se segmenta la matriz de datos en función del tiempo de almacenamiento, para ver si las diferencias son a lo largo de todo el periodo de almacenamiento o son puntuales. Se aplica el test de t de Student para muestras apareadas en las comparaciones por parejas (muestras con mTG versus muestras sin mTG) en los diferentes tiempos de almacenamiento. Las diferencias a un nivel de  $p < 0.05$  se consideran estadísticamente significativas.

Se usa el test de Dunnett para identificar diferencias significativas comparando cada uno de los días de muestreo durante el almacenamiento (7 y 14 días) con el “día 0” (Makhoul *et al.*, 2006; Hough and Garitta, 2012). Además, se realiza un análisis factorial múltiple (MFA) (Lê and Worch, 2015; Esmerino *et al.*, 2017) para evaluar conjuntamente todas las variables a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson se evalúa la fuerza y dirección de la relación lineal entre los parámetros sensoriales evaluados por el panel de catadores entrenado y la aceptación del consumidor (Barbosa *et al.*, 2019).

Para todos los test se considera un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

Los análisis estadísticos se realizan con IBM SPSS Statistics 24 y con el lenguaje R (R Core Team, 2018). Se utilizan los paquetes FactoMineR (Lê *et al.*, 2008) y agricolae (De Mendiburu, 2017) de R.

## 11.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 11.3.1 Aceptación y preferencia del consumidor

Los resultados de la evaluación del aspecto, el olor, el sabor, la textura y la aceptación global de las muestras de queso por parte de los consumidores, se muestra en la figura 11.1.

Se observa que todos los atributos hedónicos evaluados en las 4 muestras analizadas se puntúan en la parte positiva de la escala (6-me gusta ligeramente a 9-me gusta muchísimo).

La muestra coagulada con cuajo animal (A) obtiene las puntuaciones más altas en el aspecto, observándose que un 85.0% de consumidores puntúan el aspecto en la parte positiva de la escala y solamente un 6.0% lo hacen en la parte negativa (4-me disgusta ligeramente a 1-me disgusta muchísimo).

Cuando el cuajo animal se combina con la mTG (A+TG) se observa una caída estadísticamente significativa en la aceptación del aspecto (20% de valoraciones en la parte de rechazo de la escala).

En la valoración de la textura, el queso coagulado con cuajo vegetal, e incubado previamente con mTG (V+TG), obtiene puntuaciones significativamente más altas (72.0% de los consumidores puntúan en la parte positiva de la escala) que el queso coagulado con cuajo animal e incubado con mTG (A+TG), que presenta un 30% de valoraciones en la parte negativa de la escala. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre las muestras tratadas con mTG y su correspondiente control sin mTG.

En la valoración del olor, el queso V+TG obtiene un 68% de puntuaciones en la región de aceptación y un 14% en la región de rechazo. En torno a un 20% de consumidores se posicionan en la región neutra de la escala (5-ni me gusta ni me disgusta). No se observan diferencias estadísticamente significativas en la aceptación del olor de los quesos analizados.

Las valoraciones del sabor y la aceptación global, siguen en ambos casos la misma tendencia. El queso coagulado con cuajo vegetal y sin mTG (V) es el menos aceptado y al añadir la mTG (V+TG) se observa un incremento significativo de la aceptación, incrementándose el porcentaje de consumidores que puntúa en la región de aceptación del 56.0 a 74.0% en el sabor y del 58.0 a 77.0% en la aceptación global. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre la muestra coagulada con cuajo animal y tratada con mTG (A+TG) y la muestra control (A).

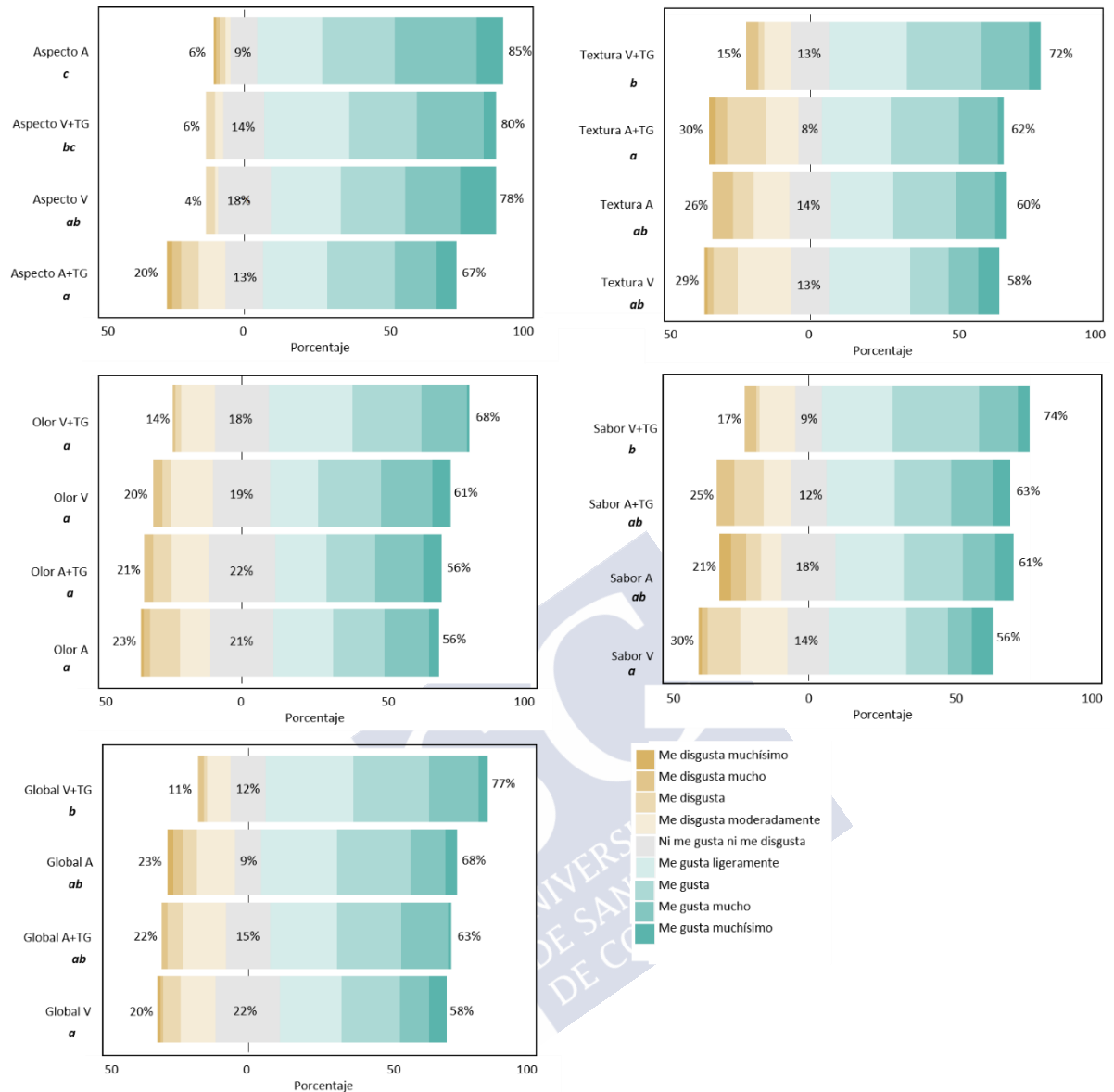


Figura 11.1. *Likert plot* para el aspecto, la textura, el olor, el sabor y la aceptación global para las muestras de queso (A: cuajo animal; A+TG: cuajo animal y mTG; V: cuajo vegetal; V+TG: cuajo vegetal y mTG). Cada valor representa el porcentaje de consumidores puntuando en cada uno de los puntos de la escala estructurada de 9 puntos (1-me disgusta muchísimo a 9-me gusta muchísimo). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras según el test no paramétrico de suma de rangos análogo al test de LSD de Fisher.

Estos resultados son confirmados por otras investigaciones en las que no se encuentran diferencias significativas en el día 0 de almacenamiento en cuanto a la textura, el sabor y en la valoración global, entre un queso tratado con mTG y un control sin mTG usando como coagulante cuajo animal (Mahmood and Sebo, 2009).

Sin embargo, otros estudios observan que un queso tipo Gouda, elaborado con leche desnatada y tratada con mTG es mejor valorado, en cuanto a la apariencia, la textura, el sabor y en global, que un queso control sin mTG, obteniendo mejor valoración al incrementar la dosis de mTG, aunque el tipo de cuajo empleado no es descrito (Ahmed *et al.*, 2015). Otros investigadores, obtienen valoraciones ligeramente superiores en la textura y en global en un queso elaborado con leche de cabra sin usar coagulante cuando la mTG ( $4U \cdot g^{-1}$ ) se añade tras

el tratamiento térmico, aunque las puntuaciones en el sabor son ligeramente inferiores en los quesos con mTG comparados con un control sin mTG (Karzan *et al.*, 2016). Sin embargo, quesos frescos elaborados con leche de vaca incubada a 25°C durante 4 h con mTG, sometida posteriormente a pasteurización antes de añadir el coagulante, obtienen una mejor valoración del olor que la muestra control sin mTG, aunque la valoración de la apariencia es ligeramente inferior y no se observan diferencias en la valoración del sabor (Radoševi *et al.*, 2007).

Se calcula un índice de aceptación (Carbonera *et al.*, 2014; García-Gómez *et al.*, 2019b) analizando la distribución de las puntuaciones de la aceptación y el porcentaje de consumidores en cada punto de la escala (Tabla 11.1). El índice de aceptación es del 70.0% para el queso V+TG, del 65.4% tanto para el queso A como para el queso A+TG y del 65.0% para el queso V. Un 20.2% de los consumidores sitúa al queso coagulado con cuajo vegetal y mTG en la región de la escala de alta aceptación (8-9 puntos).

Tabla 10.1. Distribución de las puntuaciones de los quesos e índice de aceptación (A: cuajo animal; A+TG: cuajo animal y mTG; V: cuajo vegetal; V+TG: cuajo vegetal y mTG).

Escala	Nº de Consumidores puntuando en ese punto de la escala	Puntuación	Media	índice de aceptación	Nº de Consumidores puntuando en ese punto de la escala	Puntuación	Media	índice de aceptación
A+TG					A			
1	0	0	0.00	0.00	2	2	0.02	0.22
2	2	4	0.04	0.45	3	6	0.06	0.67
3	5	15	0.15	1.68	5	15	0.15	1.68
4	15	60	0.61	6.73	13	52	0.53	5.84
5	15	75	0.76	8.42	9	45	0.45	5.05
6	23	138	1.39	15.49	26	156	1.58	17.51
7	22	154	1.56	17.28	25	175	1.77	19.64
8	16	128	1.29	14.37	12	96	0.97	10.77
9	1	9	0.09	1.01	4	36	0.36	4.04
Total	99	583	5.89	65.43	99	583	5.89	65.43
V+TG					V			
1	0	0	0.00	0.00	1	1	0.01	0.11
2	2	4	0.04	0.45	1	2	0.02	0.22
3	1	3	0.03	0.34	6	18	0.18	2.02
4	8	32	0.32	3.59	12	48	0.48	5.39
5	12	60	0.61	6.73	22	110	1.11	12.35
6	30	180	1.82	20.20	21	126	1.27	14.14
7	26	182	1.84	20.43	20	140	1.41	15.71
8	17	136	1.37	15.26	10	80	0.81	8.98
9	3	27	0.27	3.03	6	54	0.55	6.06
Total	99	624	6.30	70.03	99	579	5.85	64.98

El test de rangos de Spearman ( $p < 0.001$ ) muestra una alta correlación de la aceptación global con el sabor (A:  $r = 0.897$ , A+TG:  $r = 0.866$ , V:  $r = 0.834$  and V+TG:  $r = 0.880$ ) y con la textura (A:  $r = 0.766$ , A+TG:  $r = 0.707$ , V:  $r = 0.8746$  and V+TG:  $r = 0.799$ ).

El ranking de preferencia sitúa a A+TG como el queso preferido en primer lugar, seguido del V+TG, A y V, a pesar de que V+TG obtiene un mayor índice de aceptación que A+TG. El porcentaje de encuestados que se muestran predispuestos a consumir V+TG es también menor que el que consumiría A+TG (35.4 y 39.4%, respectivamente). Los porcentajes de intención de consumo obtenidos para los quesos control V y A son ligeramente más bajos (30.3 y 33.3%, respectivamente). Es importante puntualizar que, únicamente, el 20.2, 19.2, 18.2 y 10.1% de

los encuestados descartarían totalmente para su consumo los quesos V, A+TG, A y V+TG, respectivamente. La principal motivación para el consumo son un sabor y textura agradables.

Resultados similares se obtienen en investigaciones previas acerca de los motivos de consumo en yogures elaborados con mTG (García-Gómez *et al.*, 2019c).

Los resultados de aceptación y preferencia posicionan claramente al queso coagulado con cuajo vegetal sin mTG en una posición inferior al resto de quesos testados.

Los resultados de aceptación global y preferencia no están relacionados ni con el género ni con la edad de los encuestados.

### 11.3.2 Evolución durante el tiempo de almacenamiento

Como el queso coagulado con cuajo vegetal y con mTG es el que muestra una mayor aceptación, se estudia su evolución durante 14 días para estudiar los cambios en las características físico-químicas y sensoriales durante todo el período de almacenamiento. También se evalúa la evolución de su correspondiente control sin mTG.

Se aplica el test de Dunnett para estudiar si la evolución en el tiempo de cada una de las características analizadas de cada una de las muestras es significativa en comparación con los resultados obtenidos al inicio del periodo de almacenamiento.

#### 11.3.2.1 Características físico-químicas

Los resultados obtenidos en la actividad de agua ( $A_w$ ) y el contenido en agua (W) se muestran en la figura 11.2.

Aunque la  $A_w$  aumenta con el tiempo de almacenamiento, las diferencias no son estadísticamente significativas en comparación con el valor inicial. Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas entre las muestras (Figura 11.2a).

El contenido en agua (W) es mayor para la muestra sin mTG ( $p < 0.001$ ) y disminuye de manera significativa a lo largo del tiempo de almacenamiento en ambos casos (Figura 11.2b).

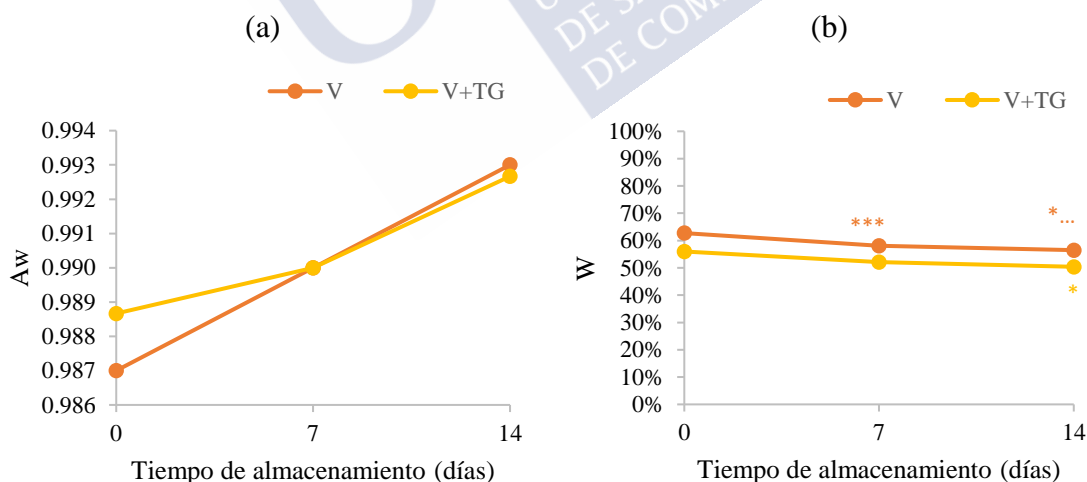


Figura 11.2. Actividad de agua ( $A_w$ ) y contenido en agua (W) durante el tiempo de almacenamiento de los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) y con cuajo vegetal y mTG (V+TG). Los valores de p para el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

La evolución en las características de textura instrumental (dureza, elasticidad, masticabilidad, cohesividad y elasticidad) se muestran en la figura 11.3.



La muestra con mTG presenta una dureza significativamente superior que el control sin mTG ( $p < 0.001$ ), disminuyendo la misma en ambas muestras de manera significativa durante el almacenamiento (Figura 11.3a). Aaltonen *et al.* (2014) también observan que la dureza de un queso Edam tratado con mTG disminuye significativamente durante el periodo de almacenamiento, la dureza del control sin mTG también disminuye, aunque en mayor medida.

En la figura 11.3b, paralelamente a lo observado para la dureza, la adición de mTG provoca un incremento significativo de la elasticidad ( $p < 0.01$ ). A pesar de que se observa una disminución en la elasticidad de ambas muestras durante el almacenamiento, éstas no son estadísticamente significativas. En otras investigaciones también se observa una disminución de la elasticidad tanto en la muestra tratada con mTG como en la muestra sin tratar (Özer *et al.*, 2013), a pesar de que se emplea como coagulante cuajo animal.

La masticabilidad también se ve modificada significativamente ( $p < 0.05$ ) por la utilización de la enzima, así las muestras con mTG presentan una masticabilidad menor que las muestras sin mTG. No se detectan diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo de almacenamiento en ninguna de las 2 muestras (Figura 11.3c).

La cohesividad y la adhesividad de ambas muestras es similar, no observándose diferencias estadísticamente significativas durante el almacenamiento (Figura 11.3.d y Figura 11.3e).



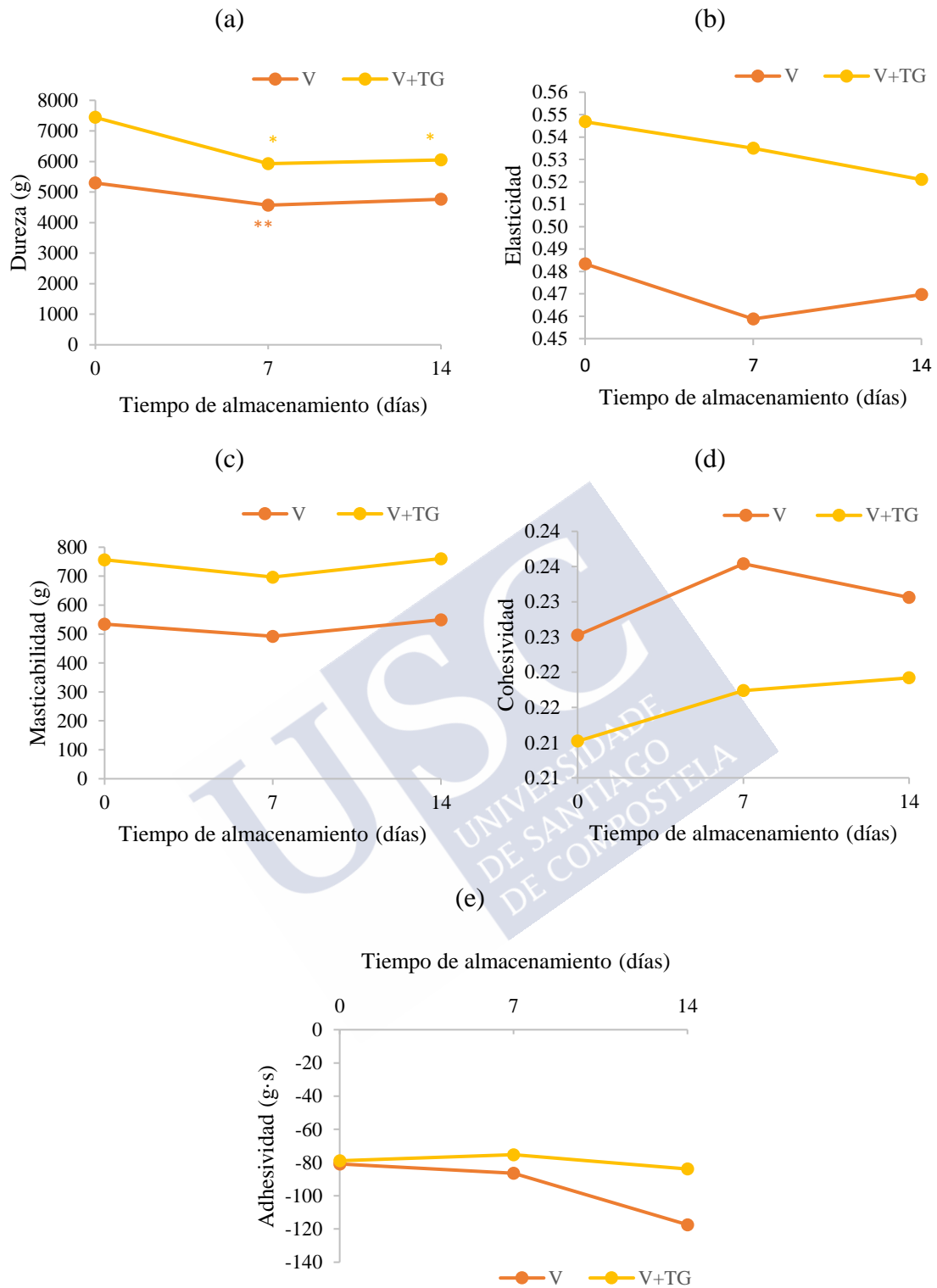


Figura 11.3 Parámetros de textura (dureza, elasticidad, masticabilidad, cohesividad y adhesividad) obtenidos en los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) y con cuajo vegetal y mTG (V+TG) a los 0, 7, y 14 días de almacenamiento. Los valores de p para el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

### 11.3.2.2 Análisis sensorial

El queso elaborado con mTG, inicialmente presenta una menor cantidad de suero visual al cortarlo que la muestra sin mTG ( $p < 0.01$ ). Se observa una disminución significativa de la cantidad de suero con el tiempo de almacenamiento en ambas muestras (Figura 11.4).

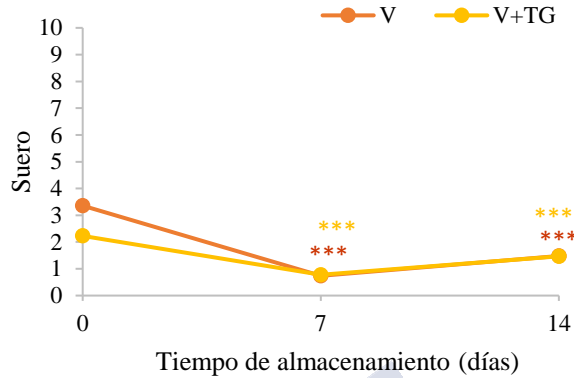


Figura 11.4. Cantidad de suero observado visualmente en los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) y con cuajo vegetal y mTG (V+TG). Los valores de  $p$  para el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

La friabilidad (Figura 11.5a) de la muestra con mTG es superior a la observada para la muestra sin mTG ( $p < 0.05$ ), observándose una disminución estadísticamente significativa en la muestra con mTG.

Sin embargo, la solubilidad de la muestra con mTG es significativamente menor ( $p < 0.05$ ), sin observarse que varíe significativamente con el tiempo en ninguna de las 2 muestras (Figura 11.5b).

La percepción de humedad en la muestra con mTG también es significativamente ( $p < 0.001$ ) más baja. Se observa un incremento en la percepción de humedad de las muestras con el tiempo de almacenamiento (Figura 11.5c), aunque este aumento únicamente es estadísticamente significativo a los 14 días de almacenamiento en la muestra con mTG.

La granulosidad de la muestra con mTG es menor que para el control sin mTG (Figura 11.5d), aunque esta diferencia únicamente es estadísticamente significativa al inicio ( $p < 0.001$ ) y al final del tiempo de almacenamiento ( $p < 0.01$ ). En ambos casos, se observa una disminución estadísticamente significativa a los 14 días de almacenamiento (Figura 11.5d).

La muestra sin mTG presenta una mayor harinosidad que la muestra con mTG hasta los 7 días de almacenamiento ( $p < 0.05$ ), aunque el día 14 es inferior ( $p < 0.01$ ). Esto es consecuencia de la disminución de percepción de harinosidad en la muestra sin mTG, disminución que se hace significativa el día 14 de almacenamiento (Figura 11.5e).

La cremosidad (Figura 11.5f) de ambas muestras es similar, aunque disminuye significativamente en la muestra sin mTG a los 14 días de almacenamiento.

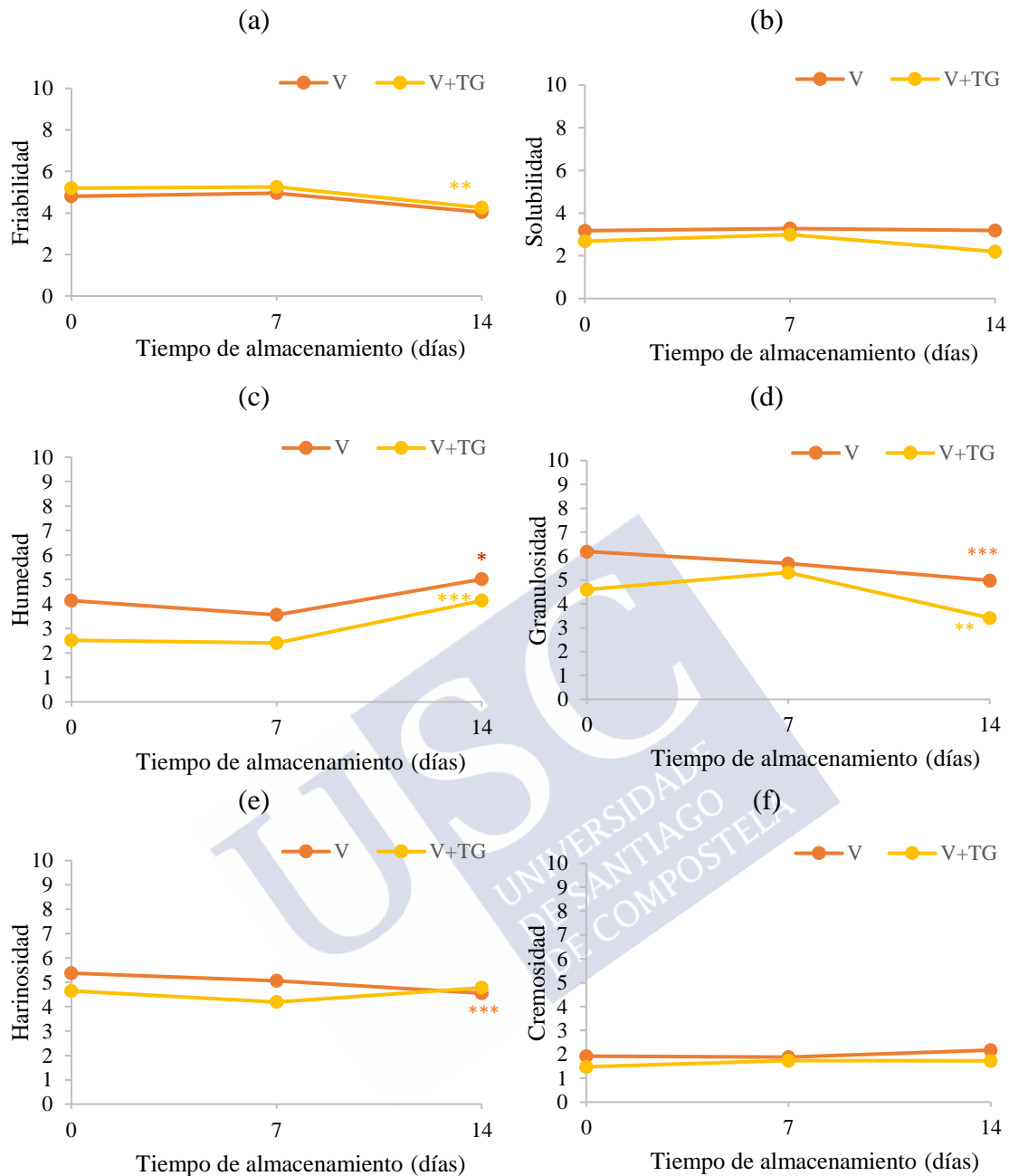


Figura 11.5. Descriptores sensoriales de textura de los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) y con cuajo vegetal y mTG (V+TG) a los 0, 7, y 14 días de almacenamiento. Los valores de p para el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Los atributos de sabor (sabor ácido y sabor amargo) son similares en las 2 muestras (con mTG y sin mTG). Tanto el sabor ácido como el sabor amargo sufren un aumento significativo durante el periodo de almacenamiento (Figura 11.6a y b).

El sabor salado de la muestra mTG es mayor que el de la muestra control sin mTG hasta el día 7 (p<0.05). La evolución del sabor salado se mantiene sin diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo en ambas muestras (Figura 11.6c). Sin embargo, Mahmood and Sebo (2009) no observan que el sabor amargo de un queso fresco elaborado con mTG se incremente a lo largo de 8 días de almacenamiento, aunque en ese estudio se utiliza como coagulante cuajo animal.

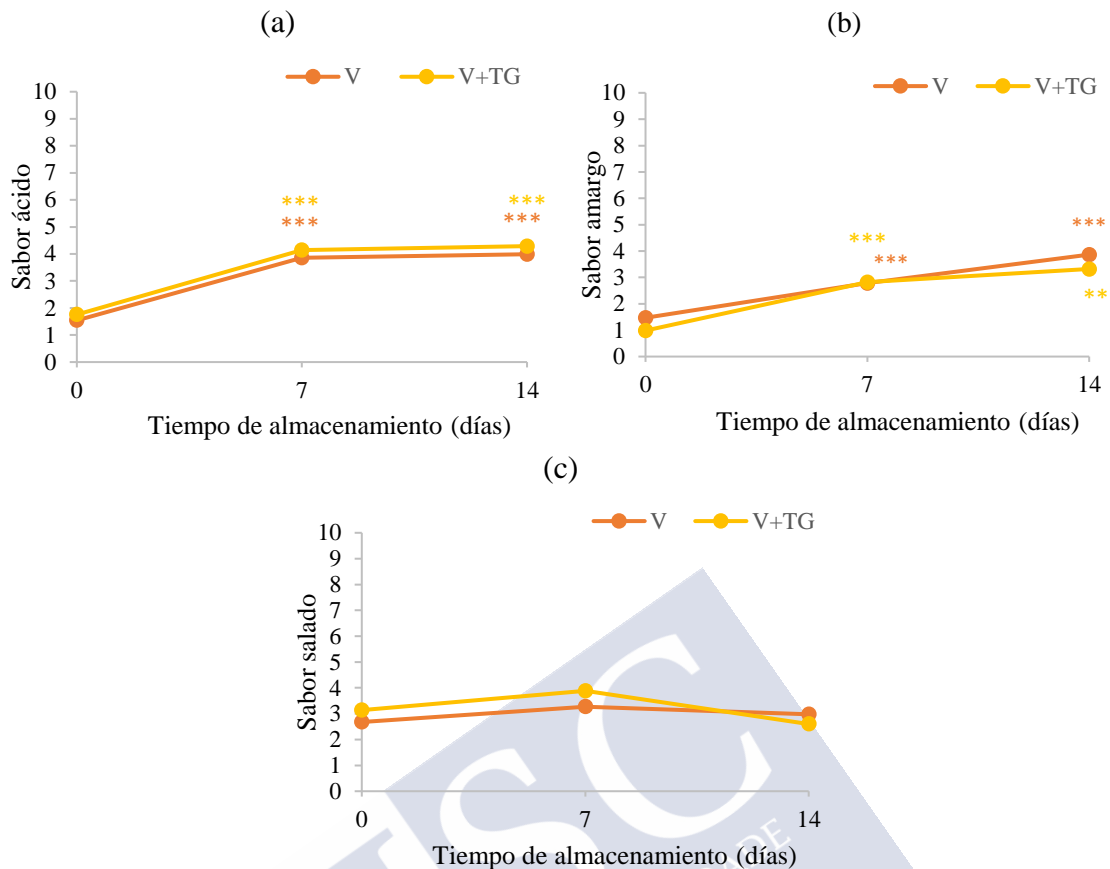


Figura 11.6. Descriptores sensoriales de sabor de los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) y con cuajo vegetal y mTG (V+TG). Los valores de p para el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

La evolución a lo largo del tiempo de almacenamiento de los atributos de aroma es paralela en ambas muestras y sin cambios significativos durante el tiempo de almacenamiento (Figura 11.7), excepto en el aroma a queso fresco, que en el caso de la muestra con mTG sufre un ligero incremento, y en la muestra sin mTG una ligera disminución (Figura 11.7b), de manera que el día 14 de almacenamiento el aroma a queso fresco de la muestra con mTG es inferior ( $p < 0.05$ ).

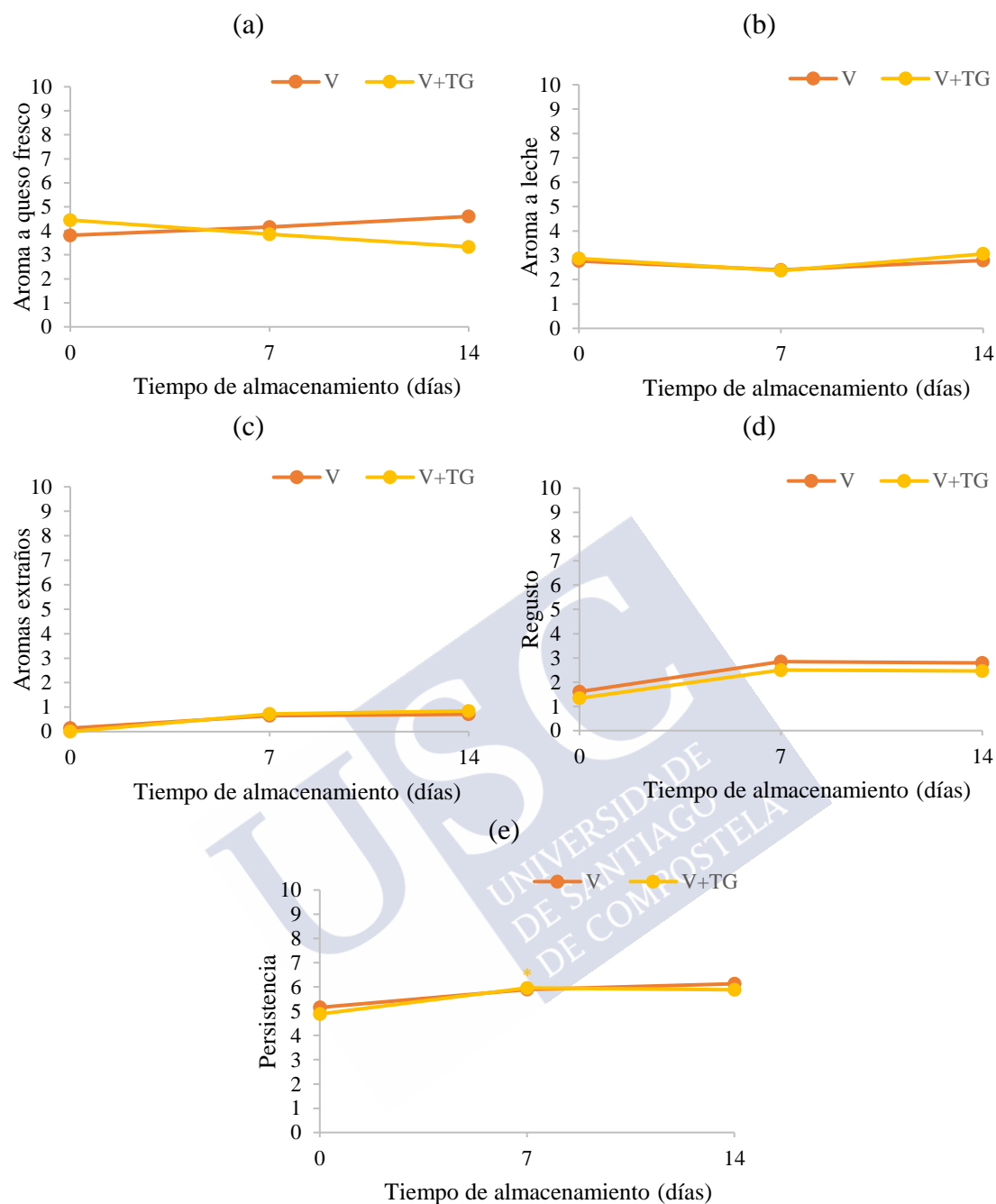


Figura 11.7. Descriptores sensoriales de aroma de para los quesos coagulados con cuajo vegetal (V) y con cuajo vegetal y mTG (V+TG). Los valores de p para el test de Dunnett comparando los diferentes tiempos con el 0: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 11.3.2.3 Relación entre las características físico-químicas y sensoriales

Se realiza un MFA para comparar el efecto del tiempo de almacenamiento en los parámetros físico-químicos, de textura instrumental y sensoriales. Se consideran, por lo tanto, 3 grupos de variables: las sensoriales, las físico-químicas y las instrumentales de textura (Figura 11.8b).

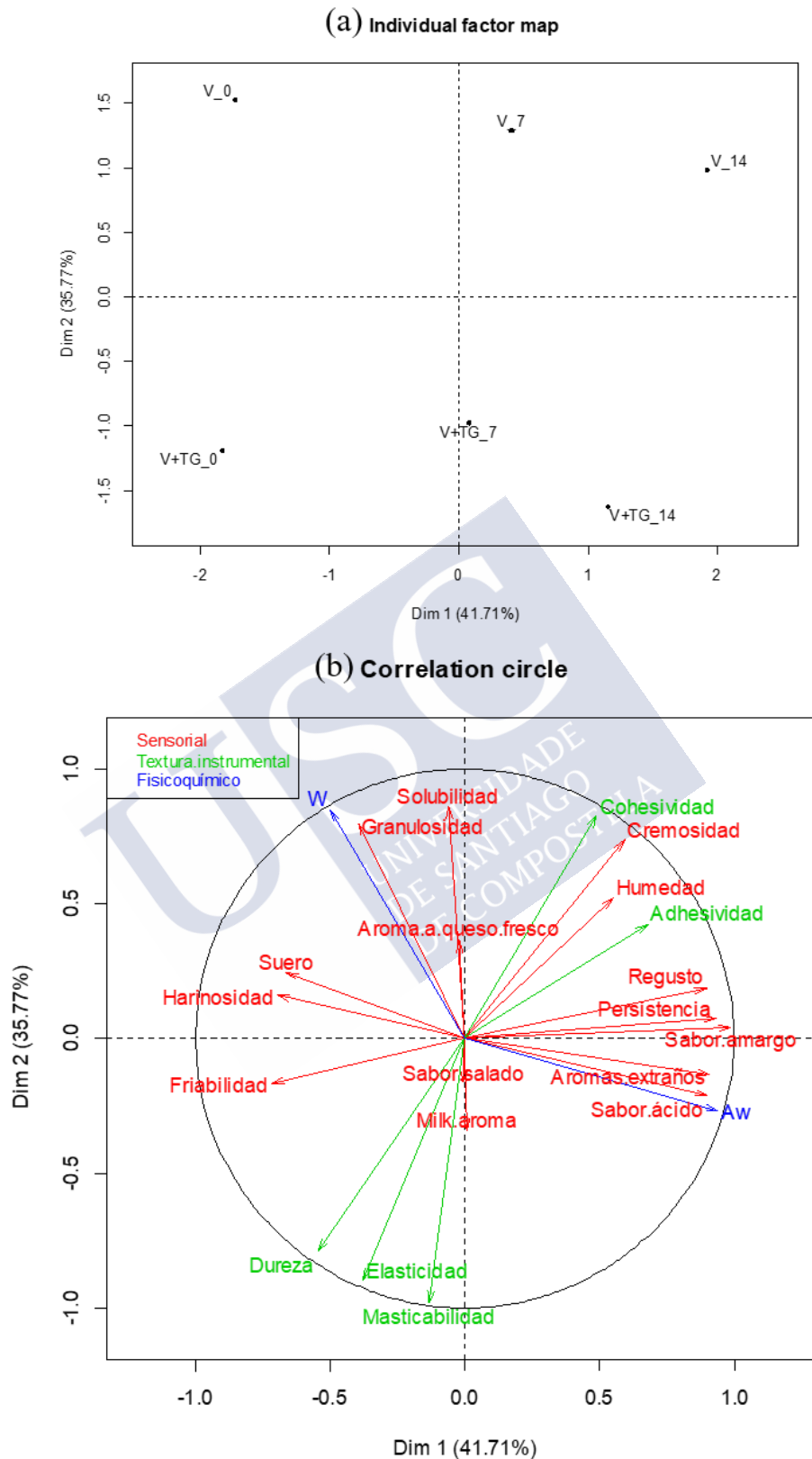


Figura 11.8. Mapa de factores individuales con componentes principales bidimensionales para los quesos a lo largo del tiempo de almacenamiento en función de las variables sensoriales, de textura instrumental y físico-químicas (a) y la representación de las medidas sensoriales, de textura instrumental y físico-químicas en las dos primeras dimensiones resultantes de un MFA a través del círculo de correlaciones (b).

Los resultados del MFA muestran que, los 2 primeros factores representan el 77.48% de la variabilidad explicada. Se recomienda analizar algunos coeficientes del MFA para una interpretación adecuada de los resultados (Lê and Worch, 2015).

El primer valor propio es superior 1.0, lo que indica una tendencia a que la primera dimensión en los grupos considerados sea homotética. Esto implica que la mayor parte de la variabilidad observada desde el punto de vista sensorial está de acuerdo con las principales diferencias encontradas en las medidas de textura instrumental y físico-químicas.

El coeficiente RV permite evaluar la fuerza de la relación entre las matrices de datos. Se obtiene un valor de 0.66 entre la matriz de datos sensoriales con los físico-químicos, un valor de 0.49 entre la matriz de datos sensoriales con la textura instrumental y un valor de 0.25 entre la matriz de datos físico-químicos con la textura instrumental. Estos resultados indican que la mayor correlación se observa entre los datos sensoriales y físico-químicos.

Las variables que muestran una correlación más alta para el eje del factor 1 (41.71%) son: el sabor amargo ( $r=0.988$ ,  $p<0.001$ ), la Aw ( $r=0.940$ ,  $p<0.01$ ), la persistencia ( $r=0.933$ ,  $p<0.01$ ), los aromas extraños ( $r=0.909$ ,  $p<0.05$ ), el sabor ácido ( $r=0.902$ ,  $p<0.05$ ) y el regusto ( $r=0.899$ ,  $p<0.05$ ) en el lado positivo del eje. Este factor describe la evolución durante el período de almacenamiento (Figura 11.8a).

Por lo tanto, valores elevados de estos parámetros son los que más se correlacionan con el tiempo de almacenamiento. La figura 11.8b indica claramente que las muestras el día 14 de almacenamiento son percibidas como más amargas, ácidas, con más regusto, persistencia y aromas extraños por los catadores y, desde un el punto de vista físico-químico, presentan una mayor Aw. No se observan muchas diferencias en la evolución de los quesos con y sin mTG.

El eje del factor 2 (35.77%) permite distinguir entre las muestras con y sin mTG (Figura 11.8a). La mayor correlación se observa con la solubilidad ( $r=0.860$ ,  $p<0.05$ ), con la W ( $r=0.851$ ,  $p<0.05$ ) y con la cohesividad ( $r=0.825$ ,  $p<0.05$ ) en el lado positivo del eje, mientras en el lado negativo del eje, la correlación más alta es con la masticabilidad ( $r=-0.980$ ,  $p<0.001$ ) y con la con la elasticidad ( $r=-0.898$ ,  $p<0.05$ ). Estas características permiten distinguir entre las muestras con y sin mTG (Figura 11.8a, b).

La figura 11.8b indica claramente que en las muestras con mTG se percibe una menor solubilidad desde un punto de vista sensorial, tienen una menor W y cohesividad y son las más elásticas y masticables desde el punto de vista de la textura instrumental.

### **11.3.3 Relación entre las evaluaciones del panel entrenado y la aceptación del consumidor**

Teniendo en cuenta que los consumidores evalúan los quesos recién elaborados, no se observa correlación estadísticamente significativa entre los atributos sensoriales evaluados por el panel de catadores entrenado y la aceptación del consumidor.

## **11.4 CONCLUSIONES**

- Los consumidores prefieren el queso coagulado con cuajo vegetal y mTG (V+TG).
- El sabor ácido, el sabor amargo, la persistencia, el regusto, los aromas extraños son los parámetros sensoriales que, junto con la Aw, más se correlacionan con la evolución de los quesos durante el almacenamiento.
- Aunque la utilización de mTG provoca cambios en las características físico-químicas y sensoriales de los quesos, durante el tiempo de almacenamiento evaluado la evolución de las muestras (con y sin mTG) es similar.



## 11.5 AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) (España) para este trabajo (proyecto RTC2014-1835-2).

## 11.6 BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, M.A., El-nimer, A.M.M., Mostafa, M.A. & Omar, H. (2015). Effect of Fat Replacer or Transglutaminase on the Quality of Low-Fat Gouda-Like Cheese. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 10, 170-180.

Almeida, C.M. & Simões, I. (2018). Cardoon-based rennets for cheese production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 4675-4686.

Aaltonen, T., Huuonen, I. & Myllärinen, P. (2014). Controlled transglutaminase treatment in Edam cheese-making. *International Dairy Journal*, 38, 179-182.

Barbosa, M. D. S. G., dos Santos Scholz, M. B., Kitzberger, C. S. G., & de Toledo Benassi, M. (2019). Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews. *Food chemistry*, 292, 275-280.

Bodyfelt, F.W., Drake, M.A. & Rankin, S.A. (2008). Developments in dairy foods sensory science and education: From student contests to impact on product quality. *International Dairy Journal*, 18, 729-734.

Carbonera, N., Mitterer-Daltoé, M.L., Lohfeldt, M.I., Pastous-Madureira, L.S., Espírito Santo, M.L.P. & Queiroz, M.I. (2014). Acceptance of fermented anchovy (*Engraulis anchoita*). *Acta Alimentaria*, 43, 239-245.

De Mendiburu, F. de. (2017). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-8.

Domagała, J., Najgebauer-Lejko, D., Wieteska-Śliwa, I., Sady, M., Wszolek, M., Bonczar, G. & Filipczak-Fiutak, M. (2015). Influence of milk protein cross-linking by transglutaminase on the rennet coagulation time and the gel properties. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 96, 3500-3507.

Drake, M.A. (2007). Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 90, 4925-4937.

Drake, M.A. & Delahunty, C.M. (2017). Sensory Character of Cheese and its Evaluation. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (editado por McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotte, P.D. y Everett, W.D.). Pag. 517-545. Ed. Academic Press. ISBN: 978-0-12-417012-4.

Esmerino, E.A., Tavares Filho, E.R., Carr, B.T., Ferraz, J.P., Silva, H.I.A., Pinto, L.P.F., Freitas, M.Q., Cruz, A.G. & Bolini, H.M.A. (2017). Consumer-based product characterization using Pivot Profile, Projective Mapping and Check-all-that-apply (CATA): A comparative case with Greek yogurt sample. *Food Research International*, 99, 375-384.

Fatima, S.W. & Khare, S.K. (2018). Current insight and futuristic vistas of microbial transglutaminase in nutraceutical industry. *Microbiological Research*, 215, 7-14.

Foegeding, E.A., Brown, J., Drake, M.A. & Daubert, C.R. (2003). Sensory and mechanical aspects of cheese texture. *International Dairy Journal*, 13, 585-591.

García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, A. & Vázquez, M. (2019a). Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh

cheese production: Effect on physicochemical and textural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 108279.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N. & Vázquez, M. (2019b). Sensory quality and consumer acceptance of skim yoghurt produced with transglutaminase at pilot plant scale. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 388-394.

García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019c). Skim yoghurt with microbial transglutaminase: evaluation of consumer acceptance. *CyTA-Journal of Food*, 17, 280-287.

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

Gharibzadeh, S.M., Koubaa, M., Barba, F.J., Greiner, R., George, 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.

Hernando, I. & Lluch, M.A. (2000). Microstructural characterization of Burgos cheese different microscopy techniques. *Food Science and Technology International*, 6, 151-157.

Hough, G. & Garitta, L. (2012). Methodology for sensory shelf-life estimation: A review. *Journal of Sensory Studies*, 27, 137-147.

Huppertz, T. & G de Kruif, C. (2007). Rennet-induced coagulation of enzymatically cross-linked casein micelles. *International Dairy Journal*, 17, 442-447.

Jaros, D. & Rohm, H. (2017). Rennets: Applied Aspects. In: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (editado por McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotte, P.D. y Everett, W.D.). Pag. 53-67. Ed. Academic Press. ISBN: 978-0-12-417012-4

Karzan, T.M., Nawal, H.S. & Ashna, T.A. (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.

Lê, S., Josse, J. & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R Software, Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical*, 25, 1-18.

Lê, S. & Worch, T. (2015). *Analyzing Sensory Data with R*. Ed. CRC Press. ISBN 978-1-4665-6572-2.

Mahmood, W.A. & Sebo, N.H. (2009). Effect of microbial transglutaminase treatment on soft cheese properties. *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 37, 19-27.

Majchrzak, D., Lahm, B. & Dürschmid, K. (2010). Conventional and probiotic yogurts differ in sensory properties but not in consumers' preferences. *Journal of Sensory Studies*, 25, 431-446.

Makhoul, H., Ghaddar, T., & Toufeili, I. (2006). Identification of some rancidity measures at the end of the shelf life of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 143-148.

OCDE/FAO (2017). *Dairy and dairy products in: OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026*. Paris. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i7465e.pdf>.

- Özer, 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.
- Özer, B., Hayaloglu, A.A., Yaman, H., Gürsoy, A. & Şener, L. (2013). Simultaneous use of transglutaminase and rennet in white-brined cheese production. *International Dairy Journal*, 33, 129-134.
- Özrenk, E. (2006). The use of transglutaminase in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 1-7.
- Portilla-Rivera, O.M., Téllez-Luis, S.J., Ramírez de León, J.A. & Vázquez, M. (2009). Production of microbial transglutaminase on media made from sugar cane molasses and glycerol. *Food Technology and Biotechnology*, 47, 19-26.
- PM Food & Dairy Consulting. (2014). The World Cheese Market Report: 2000-2020. Denmark. Disponible en: <http://www.pmfood.dk/upl/9735/WCMINFORMATION.pdf>
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing.
- Ramírez-Rivera, E.D.J., Díaz-Rivera, P., Ramón-Canul, L.G., Juárez-Barrientos, J.M., Rodríguez-Miranda, J. & Herman-Lara, E. (2018). Comparison of performance and quantitative descriptive analysis sensory profiling and its relationship to consumer liking between the artisanal cheese producers panel and the descriptive trained panel. *Journal of Dairy Science*, 101, 5851-5864.
- Romeih, E. & Walker, G. (2017). Recent advances on microbial transglutaminase and dairy application. *Trends in Food Science and Technology*, 62, 133-140.
- Souza, F.P., Balthazar, C.F., Guimarães, J.T., Pimentel, T.C., Esmerino, E.A., Freitas, M.Q., Raices, R.S.L., Silva, M.C. & Cruz, A.G. (2019). The addition of xyloligosaccharide in strawberry- flavored whey beverage. *LWT - Food Science and Technology*, 109, 118-122.
- Vázquez, M. & Guerra-Rodríguez, M.E. (2012). Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol (Patente ES 2376439).
- Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics*, 1, 80-83.
- Yüksel, Z., Avci, E. & Erdem, Y.K. (2011). Modification of the renneting process in Berridge substrate by transglutaminase. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 365-371.
- Zamora, A., Ferragut, V., Quevedo, J.M., Guamis, B. & Trujillo, A. (2012). Ultra-high pressure homogenisation of milk: technological aspects of cheese-making and microbial shelf life of a starter-free fresh cheese. *Journal of Dairy Research*, 79, 168-175.



## 12. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones obtenidas en la **aplicación de mTG en la elaboración de YOGUR FIRME DESNATADO** son:

- La adición de transglutaminasa microbiana es una alternativa factible en la elaboración de yogur firme desnatado, ya que se reducen los costes asociados a la fortificación con sólidos lácteos y/o aditivos y no se modifica la aceptación por parte de los consumidores.
- Para la utilización de transglutaminasa microbiana en la elaboración de yogur firme desnatado, se comprueba que el método de adición simultánea del cultivo iniciador y la enzima, en una dosis de  $0.76 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$  de proteína, es el más adecuado.

Las conclusiones obtenidas **en la aplicación de mTG combinada con diferentes cuajos en la elaboración de QUESO FRESCO** son:

- Las características sensoriales y físico-químicas de los quesos se ven modificadas por el tratamiento con mTG, siendo los quesos elaborados con cuajo animal los más afectados y los elaborados con cuajo vegetal los preferidos por los consumidores.
- La elaboración de queso fresco utilizando cuajo vegetal y adicionando transglutaminasa microbiana es una alternativa factible ya que la evolución de sus características a lo largo del tiempo de almacenamiento es similar a la de los quesos que no la llevan adicionada y, además, se mejora ligeramente el rendimiento.



## 13. ANEXOS



## ANEXO 1

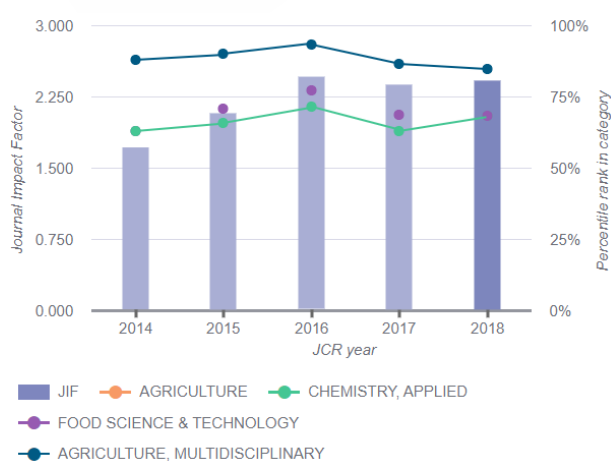
Referencia de la publicación: García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2018). Physicochemical evaluation of low-fat yoghurt produced with microbial transglutaminase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5479-5485.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9092>

Revista: JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE

ISSN: 0022-5142

Editorial: WILEY

Índice de impacto en 2018: 2.422





## ANEXO 2

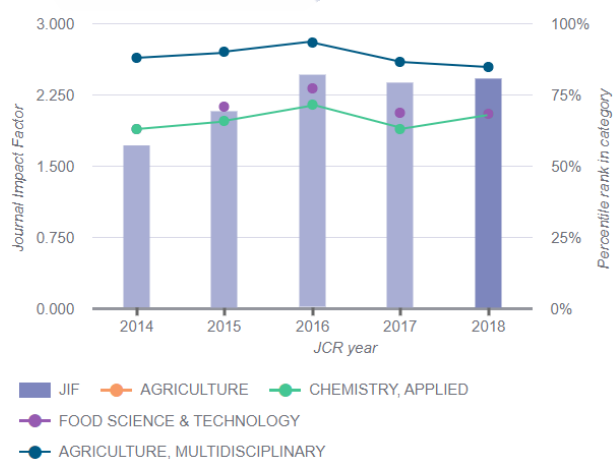
Referencia de la publicación: García- Gómez, B., Romero- Rodríguez, Á., Vázquez- Odériz, L., Muñoz- Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019). Sensory evaluation of low- fat yoghurt produced with microbial transglutaminase and comparison with physicochemical evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 2088-2095.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9401>

Revista: JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE

ISSN: 0022-5142

Editorial: WILEY

Índice de impacto en 2018: 2.422



## ANEXO 3

Referencia de la publicación: García- Gómez, B., Romero- Rodríguez, Á., Vázquez- Odériz, L., Muñoz- Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019). Sensory quality and consumer acceptance of skim yoghurt produced with transglutaminase at pilot plant scale. *International Journal of Dairy Technology*, 72, 388-394.  
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12595>

Revista: INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY

ISSN: 1364-727X

Editorial: WILEY

Índice de impacto en 2018: 1.522



## ANEXO 4

Referencia de la publicación: García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. (2019). Skim yoghurt with microbial transglutaminase: evaluation of consumer acceptance. *CyTA-Journal of Food*, 17, 280-287. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1577304>

Revista: CYTA-JOURNAL OF FOOD

ISSN: 1947-6337

Editorial: TAYLOR & FRANCIS LTD

Índice de impacto en 2018: 1.605



## ANEXO 5

Referencia de la publicación: García-Gómez, B., Romero-Rodríguez, Á., Vázquez-Odériz, L., Muñoz-Ferreiro, N., & Vázquez, M. Effect of storage time on sensory and instrumental properties of skim-milk yoghurt obtained with microbial transglutaminase. *International Journal of Dairy Technology*. In press.  
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12648>

Revista: INTERNATIONAL JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY

ISSN: 1364-727X

Editorial: WILEY

Índice de impacto en 2018: 1.522



## ANEXO 6

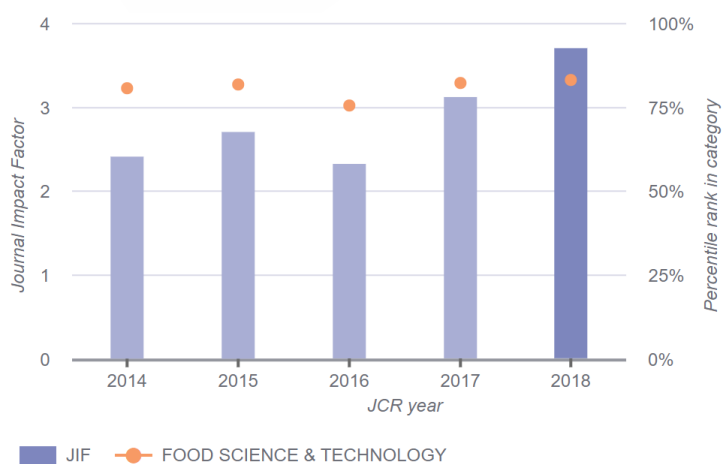
Referencia de la publicación: García-Gómez, B., Vázquez-Odériz, M. L., Muñoz-Ferreiro, N., Romero-Rodríguez, M. Á., & Vázquez, M. (2019). Interaction between rennet source and transglutaminase in white fresh cheese production: Effect on physicochemical and textural properties. *LWT-Food Science and Technology*, 113. In press. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108279>

Revista: LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

ISSN: 0023-6438

Editorial: ELSEVIER SCIENCE BV

Índice de impacto en 2018: 3.714



## **ANEXO 7**

Enviado a revista: European Food Research and Technology (24-10-2019).

