



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

“OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS DE PROTEÍNA
FUNCIONAL DE MÚSCULO DE CALAMAR GIGANTE
(*Dosidicus gigas*)”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Hugo Palafox Carlos

La Paz, Baja California Sur, abril de 2008

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Fernando Luís García Carreño

Director de Tesis

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Co-tutor

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Co-tutor

COMITÉ DE REVISIÓN

Dr. Fernando Luis García Carreño

CIBNOR, S. C.

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

CIBNOR, S. C.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

CIAD, A. C.

JURADO EN EXAMEN DE GRADO

Dr. Fernando Luís García Carreño

Dr. Julio Humberto Córdova Murueta

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Dr. Salvador E. Lluch Cota (Suplente)

Resumen

El calamar gigante, *Dosiducus gigas*, es una especie de gran importancia para la región noroeste de México, sobre todo por su abundancia y la pesquería que sostiene. Sin embargo, a pesar de ser una pesquería rentable, existe la problemática de bajo precio en el mercado interno y exportación, siendo la causa de esto la falta de tecnologías para su adecuado procesamiento y obtención de productos de mayor aceptación o valor y el escaso consumo interno. Una manera de abordar una solución a esto sería la generación de conocimiento que fortalezca nuevas tecnologías. Varios métodos han sido implementados para aislar proteínas funcionales de músculo de especies marinas. Tales procesos están basados en la solubilización a pH ácido o alcalino (*pH shift processing*) de las proteínas musculares, que permite obtener concentrados de proteína (CP) con valor nutricional, funcional y por ende comercial. En este trabajo, se enfocó en evaluar la eficiencia y viabilidad de los procesos de solubilización a pH ácido y alcalino para obtener concentrados de proteína funcional a partir de músculo de calamar con diferentes tratamientos de preparación y/o condiciones de congelación, así como también la caracterización de las propiedades funcionales de los concentrados de proteína obtenidos. Se analizó la capacidad de emulsión, formación de espuma y gelificación de los concentrados de proteína de ambos procesos.

Se observó que 85% del total de las proteínas de músculo se solubilizan a pH 3.0 y pH 11.0 y de estas, más del 90% precipitan a pH 5.5 como proteínas funcionales de interés. Las principales proteínas recuperadas son miosina, paramiosina y actina. Se obtuvo un rendimiento total de 77 % de recuperación de proteína en el proceso ácido y 79% en el proceso alcalino. Debido a que se observó la presencia de agregados de diferentes pesos por arriba de las 200 kDa durante el procesos de pH shift, se presume de la formación de enlaces disulfuro, lo que provocó polimerización de miosina, sobre todo en el proceso de solubilización a pH alcalino, lo cual repercutió positivamente en la capacidad de gelificación. Los CP funcional de ambos procesos ácido y alcalino mostraron excelente capacidad de emulsión (34-44%), incluso superiores a los valores obtenidos en el grupo control: albúmina de huevo (32.8%) y músculo de calamar (28%). La capacidad de formación de espuma de los CP de ambos procesos (160.2%) fue menor que el grupo control (432% y 187%, respectivamente). El CP del proceso alcalino mostró la mejor fuerza de gel (503 N.mm/g) respecto al CP del proceso ácido (358 N.mm/g) e incluso mejor que el músculo de calamar (59.6 N.mm/g). Se observó que los diferentes tratamientos de congelación/molienda sobre el músculo de calamar

repercutieron sobre la funcionalidad de los concentrados de proteína, y se observó que entre más severas las condiciones desnaturalizantes, mejor fueron las propiedades funcionales de emulsión y espumado.

Los concentrados de proteína (CP) obtenidos de los procesos de solubilización a pH ácido y alcalino respondieron funcionalmente de manera similar. Sin embargo, es necesario realizar investigación que ayude a entender de manera más detallada los cambios y fenómenos químicos ocurridos en las proteínas de calamar bajo tales condiciones de procesamiento. Se logró recuperar más del 90% del agua de proceso al final de ambos tratamientos, la cual podría ser reutilizada. Por último se concluye, que el proceso de *pH shift* es una alternativa tecnológica para ser implementada en el procesamiento de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) no congelado e incluso sometido a “severas” condiciones desnaturalizantes por congelación.

Palabras clave: músculo de calamar, concentrado de proteína, proceso ácido y alcalino.

Vo. Bo. Dr. Fernando L. García Carreño

Director de Tesis

Abstract

Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) fishery is an abundant source in the Pacific coast of Mexico and in many regions of the world. However, the importance of the squid industry is more related on the abundant of this organism that in its economical earns. The squid muscle is a low value product in the market in part because the muscle has undesirable characteristics and there is not efficient technology to produce high value products. However, the squid muscle has attractive properties to produce high quality protein concentrates useful in food production as raw material or functional ingredient. The aim of this work is to give value to the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) fishery of the Pacific coast of Mexico. One approach is to increase knowledge supporting technology for transforming muscle protein. Squid muscle has properties that may be useful for producing protein concentrates that can be used in food products as raw material or ingredient. Development of new products would increase the prosperity of the fishery and people involved. This work describes two procedures (pH shift processing) to process muscle of jumbo squid to obtain protein concentrates (PC) with functional properties for economic revenue. Squid muscle with different preparations (frozen/ground combinations) was used to evaluate its effect on PC's functionality.

Process is based on solubilization and precipitation of much of the muscle protein. Squid muscle proteins were extracted using acid and basic solutions. About 85% of initial muscle proteins were solubilized at pH values of 3.0 and 11.5 and from this portion about 90%, was recovered after precipitation at pH 5.5 regardless of the solubilization pH value. The total yield for both procedures was 75%. Functional characterization showed that the PCs from both acid and alkaline processes have excellent emulsion capacity (34-44%) with values higher than control group: albumin (32.8%) and squid muscle (28%). Foaming capacity of PCs from both acid and alkaline processes was lower (160.2%) than compare with control group (432% and 187%, respectively). PC from alkaline process showed the best gel strength (503 N.mm/g) respect to PC from acid process (358 N.mm/g) and even squid muscle (59.6 N.mm/g).

The different preparations of squid muscle had effect on the PC's functionality. About 90% of the water used in the process is recovered. This study demonstrated that acid and alkaline processing conditions are an efficient and feasible alternative for recovering functional PC from squid muscle even if the muscle underwent "severe" frozen denaturizing conditions.

Key words: squid muscle, protein concentrates, acid and alkaline processing.

A mis papas, a mis hermanos y a toda la familia Carlos

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo mexicano, porque a través de CONACYT (Beca 2001343) y otros organismos federales se financió la presente investigación. Ciertamente, a nuestro pueblo le ha costado mucho sostener la investigación nacional, por lo que espero algún día poder retribuírselo a México, quien ha invertido en mí para tener un mejor mañana.

Al laboratorio de bioquímica (BQ) por apoyar esta investigación y mi formación académica. Gracias por todos sus consejos, guía, infraestructura y recurso humano otorgado.

Al personal de la dirección de posgrado: **Dra. Thelma Castellanos, Osvelia, Lety, Lupita, Claudia, Betty y Horacio**. Muchas gracias por su eficiencia, disponibilidad, apoyo, comprensión y amabilísima atención guante todo el desarrollo de la maestría.

A Fer, por todas tus valiosas enseñanzas, orientación, guía y los jalones de oreja que me diste, pero sobre todo por tu auténtico compromiso de formar y forjar a las nuevas generaciones de investigadores. Gracias a ti, me inicié en esta aventura de la investigación. Gracias por todo lo bueno y también lo malo. Siempre recordare tus consejos.

A Ann, Julio y Paty, por la ayuda incondicional, por la amistad y por compartir su valiosa experiencia para ayudarme durante toda esta valiosa etapa de mi carrera. Muchas gracias por auxiliarme en mi vida profesional y a veces en la personal.

A Ana Maria y Tony porque que siempre me recibieron con una autentica sonrisa y verdadero calor humano. ¡Gracias!

A Mariana, por haber sido una de las chispas motivadoras en mis inicios y por apoyarme en diversos aspectos de mi vida profesional y personal. Gracias Marianiux, algún día te lo pagare con creces.

A todos los estudiantes y amigos que me acompañaron durante el desarrollo de mi tesis en BQ y en el CIBNOR. Han sido tantos y a cada uno de ustedes los recordare con mucho cariño, en especial a **Keni, Cris y Yupit**, porque ustedes estuvieron a mi lado luchando cada una de las batallas dentro y fuera del laboratorio.

A Angélica Herrera S., por todo el amor, apoyo y comprensión durante todo esta etapa. A pesar de la distancia (más de un año) me diste fuerzas, muchas alegrías y razones para luchar por mis metas. Te debo mucho mi *mimosita*, siempre estarás en mi corazón. ¡Gracias por ayudarme a escribir esta historia en La Paz! ... ILUSM.

A mis padres, a mis hermanos y a toda la familia Carlos por todo el impulso, motivación, fuerza y entereza que me han dado hasta ahora. Cada triunfo y adversidad ha sido de todos. Siempre han estado conmigo y siempre serán mi mayor alegría y motivo de superación. Los amo a todos.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Características Biológica del Calamar.....	4
2.2 Anatomía y Estructura del Músculo.....	6
2.3 Proteínas Musculares del Calamar.....	9
2.4 La Pesquería del Calamar.....	10
2.5 Precio y Situación en el Mercado.....	11
2.6 Procesamiento del Calamar.....	12
2.7 Potencial Uso de Proteínas Musculares de Calamar: Problemáticas e importancia.....	14
2.8 Proceso de solubilización a pH Ácido y Alcalino (<i>pH Shift Processing</i>).....	17
2.9 Propiedades Funcionales de las Proteínas Musculares.....	23
2.10 Desnaturalización de Proteínas.....	27
III. HIPOTESIS.....	29
IV. OBJETIVO.....	29
4.1 Objetivo General.....	29
4.2 Objetivos Específicos.....	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Preparación de la Materia Prima.....	30
5.2 Preparación del Homogenizado de Músculo.....	32
5.3 Solubilidad de las Proteínas Musculares.....	33
5.3.1 Curva de Solubilidad.....	33
5.3.2 Solubilidad Antes de la 1 ^{ra} Centrifugación (Etapa de Solubilización).....	34
5.3.3 Contenido de Proteína en el Homogenizado Inicial.....	34
5.3.4 Solubilidad después de la Precipitación Isoeléctrica (Etapa de Precipitación).....	35
5.4 Cálculos de Porcentaje de Solubilidad.....	35

5.5 Perfil de Proteínas por SDS-PAGE.....	36
5.6 Obtención de los Concentrados de Proteína.....	37
5.7 Propiedades Funcionales.....	39
5.7.1 Emulsión.....	39
5.7.2 Espumado.....	39
5.7.3 Evaluación de la Capacidad de Formar Geles.....	40
5.8 Análisis Estadístico.....	42
VI. RESULTADOS.....	42
6.1 Solubilidad de las Proteínas Respecto al pH.....	42
6.2 Solubilidad, Precipitación y Recuperación de Proteína por los Procesos Ácido y Alcalino (pH Shifts).....	44
6.3 Obtención de Concentrados de Proteína.....	46
6.4 Agua al Final de los Procesos Acido y Alcalino.....	48
6.5 Composición de Proteína por SDS-PAGE	50
6.5.1 Solubilidad de las Proteínas de calamar respecto al pH.....	50
6.5.2 Solubilidad y recuperación de proteínas en los procesos ácido y alcalino.....	51
6.5.3 Formación de agregaciones vía enlaces disulfuro.....	53
6.6 Capacidad y Estabilidad de Emulsión de los Concentrados de Proteína del proceso Ácido y Alcalino.....	54
6.7 Capacidad y Estabilidad de Emulsión de los Concentrados de Proteína del proceso Ácido y Alcalino.....	57
6.8 Capacidad de Gelificación de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino.....	60
VII. DISCUSION.....	62
7.1 Solubilidad de las Proteínas de Calamar Respecto al pH.....	62
7.2 Solubilidad, Precipitación y Recuperación de Proteína por los Procesos Ácido y Alcalino (pH <i>Shift</i>).....	64
7.3 Obtención de Concentrados de Proteína y Recuperación de Agua de los Procesos Ácido y Alcalino.....	69
7.4 Composición de Proteínas por SDS-PAGE	71
7.4.1 Solubilidad de las Proteínas de calamar Respecto al pH.....	71
7.4.2 Solubilidad y recuperación de proteínas en los procesos ácido y	71

alcalino.....	
7.4.3 Análisis de SDS-PAGE en Condiciones Reductoras y No Reductoras...	73
7.5 Capacidad y Estabilidad de Emulsión de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino	74
7.6 Capacidad y Estabilidad de Formación de Espuma del Proceso Ácido y Alcalino.....	77
7.7 Capacidad de Gelificación de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino.....	80
VIII. CONCLUSIONES.....	83
IX. PERSPECTIVAS	85
X. REFERENCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	5
Fig. 2 Anatomía básica del calamar.....	7
Fig. 3 Arreglo básico del músculo de calamar.....	8
Fig. 4 Diagrama esquemático del proceso ácido y alcalino para la obtención de concentrados de proteína.....	19
Fig. 5 Solubilidad de las proteínas de calamar en el rango de pH 2.0-12.0.....	44
Fig. 6 Electroforesis de las proteínas solubles a diferentes valores de pH (2.0- 12.0).....	51
Fig. 7 - SDS-PAGE de proteína de las diferentes etapas del proceso ácido y alcalino	52
Fig. 8 SDS-PAGE de muestras de proteína en condiciones reductoras y no reductoras de las diferentes etapas del proceso ácido y alcalino.....	54
Fig. 9 Capacidad de formación de emulsión de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos.....	55
Fig. 10 Estabilidad de la emulsión generada por los concentrados de proteína obtenidos de los procesos de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos.....	56
Fig. 11 Capacidad de formación de espuma de los concentrados de proteína	

obtenidos de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos.....	57
Fig. 12 Estabilidad de la espuma generada a partir de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos de los procesos ácido (Pac) y alcalino (Pal) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos.....	59
Fig. 13 Dureza de los geles elaborados a partir de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos	61

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Precios registrados para el calamar de exportación.	12
Tabla 2. Rendimientos de recuperación de proteína utilizando los procesos ácido y alcalino.....	46
Tabla 3. Rendimientos totales en la obtención de concentrados de proteínas de músculo de calamar con diferentes tratamientos empleando los procesos ácido y alcalino.....	48
Tabla 4. Volumen total de agua recuperada al final del proceso ácido y alcalino.....	49
Tabla 5. Análisis de perfil de textura y CRA de los geles a partir de los CP de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) con diferentes tratamientos. Geles de músculo de calamar fueron evaluados como control.	62

LISTA DE IMAGENES

Imagen 1. Material no soluble y sedimentado después de la 1 ^{ra} centrifugación	45
---	----

Imagen 2. Concentrado de proteína obtenido por los procesos de ácido y alcalino.	47
Imagen 3. Agua al final del los procesos ácido o alcalino.....	49

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante es una especie de interés pesquero. En la región noroeste, la mayor captura ocurrió en 1997, con 121,016 t. Después de ese año, las capturas disminuyeron, y no fue hasta el 2002 cuando se alcanzó una captura de 115,964 t. Las capturas registradas en Baja California Sur a partir de 1998, han aportado aproximadamente entre el 60% y 90% de las capturas totales donde en 2002, la captura fue de 106,887 t, disminuyendo nuevamente en el 2003 a 54,929 t y en 2004 fue de 49 579 t (Instituto Nacional de la Pesca, 2006). El principal destino de exportación es el mercado asiático, 18 millones de USD en 1997. Sin embargo, a pesar de ser una pesquería establecida, existe el problema del bajo precio en el desembarco (Instituto Nacional de la Pesca, 2006). El consumo interno es limitado por hábitos alimenticios, el sabor ácido-amargo y olor a amoníaco. Además, no se han desarrollado procesos para elaborar productos de mayor valor. Quizá debido al inadecuado manejo post-captura que resulta en deterioro del producto.

Una razón que ha evitado el procesamiento de calamar gigante es el argumento relacionado a pobres propiedades funcionales debidas a alta actividad proteolítica endógena (Ayensa *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003). Aunado a esto, el uso de proteínas del músculo tanto de calamar gigante como de especies marinas subvaluadas, como fuente directa de alimento y como ingrediente alimenticio, ha sido limitado debido a varias razones, como lo son rápida degradación por bacterias, baja estabilidad comparada con proteínas de mamíferos y vegetales y pérdidas de funcionalidad durante el procesado de la materia prima (Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2003; Mackie, 1994).

Recientemente, gracias a investigaciones por parte de varios grupos especializados en ciencia y tecnología de alimentos que han abordado trabajos desde bioquímica postmortem del calamar hasta cambios estructurales en proteínas bajo diferentes condiciones de almacenamiento y procesamiento (Mackie 1994; Gómez *et al*, 1997; Ayensa *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003 ; Sánchez *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004 ; de la Fuente, 2006; Sánchez *et al*, 2007), se ha encontrado que las proteínas del músculo de calamar gigante presentan buena funcionalidad (Sánchez *et al*, 2007), buena digestibilidad (Gómez *et al*, 2003) y adecuado contenido de aminoácidos esenciales (de la Fuente, 2006), lo cual hace pensar que derivados proteicos de calamar pueden ser una fuente útil para una gran variedad de aplicaciones en la industria de alimentos. Además, se ha evidenciado que el músculo de calamar bajo adecuado manejo post-captura y buenas prácticas de almacenamiento muestra baja actividad proteolítica endógena (de la Fuente, 2006).

Hay interés en aumentar el uso de proteínas musculares como fuente de alimento y como ingrediente en la industria de alimentos, si éstas poseen propiedades funcionales adecuadas (Xiong, 1997; Hultin y Kelleher, 1999).

Las proteínas musculares están clasificadas en sarcoplásmicas y miofibrilares. Estas últimas son las responsables de presentar propiedades funcionales útiles en tecnología de alimentos como espumados, emulsión y gelificación. Actualmente existe interés en la búsqueda de nuevas especies como fuente redituable de proteínas musculares (Undeland y Kelleher, 2002). A su vez, el conocimiento científico sobre la solubilidad de proteínas musculares es de gran importancia debido a la relación con muchas características funcionales de interés en la industria de alimentos (Stefansson y Hultin, 1994).

Varios métodos han sido implementados para aislar proteínas funcionales de músculo de especies marinas, pero han afectado negativamente las propiedades funcionales, sobre todo la capacidad de gelificación (Hultin, 2002). Actualmente, métodos de procesamiento que se centran en mantener las propiedades funcionales de las proteínas musculares están siendo preferidos y existe una gran atención sobre ellos (Kristinsson y Liang, 2006). Un ejemplo de procesos exitosos es el de elaboración de surimi, el cual involucra el lavado del músculo de pescado y la adición de crioprotectantes para mantener estables a las proteínas durante la congelación y se intentó implementar para producir surimi de músculo de calamar gigante con el fin de maximizar su valor agregado. Sin embargo, se encontraron resultados desfavorables, debido a que el proceso de lavado es de bajo rendimiento, ya que la fracción miofibrilar es altamente soluble en agua (Sánchez *et al.*, 2007).

Un proceso innovador (*pH shift processing*) para recuperar proteína funcional de músculo ha sido desarrollado en la Universidad de Massachussets (Hultin y Kelleher, 1999). El proceso *pH shift* involucra la solubilización de la proteína fibrosa a pH ácido o alcalino y la posterior precipitación iso-eléctrica, otorgándoles estabilidad y alta funcionalidad a las proteínas recuperadas. El proceso tiene aplicación en especies marinas subutilizadas y de bajo valor económico (Hultin y Kelleher, 1999; Hultin y Kelleher, 2000; Hultin, 2002; Hultin *et al.*, 2000; Kristinsson y Hultin, 2003 a, b; Undeland *et al.*, 2002; Choi y Park, 2002). Tal proceso pretende ser una de las opciones más atractivas y viables para procesar músculo de calamar gigante.

El calamar es un recurso pesquero con potencial para el desarrollo de productos con valor agregado, ya que bajo buenas practicas post-captura el músculo calamar presenta olor suave, color blanco (Sánchez *et al.*, 2007), bajo valor, alto contenido de proteína (de la Fuente, 2006), el recurso es abundante y existe presión por parte de los productores primarios por procesarlo. Por consiguiente, en este trabajo se presentan análisis donde se evalúan dos procesos de *pH shift* (solubilización a pH ácido y alcalino) como alternativas para obtener concentrados de proteína funcional a partir de músculo de calamar congelado y no congelado. También se abordaron análisis de solubilidad de proteínas musculares en diferentes tratamientos de almacenamiento y a diferente pH. Por otra parte, se evaluaron las propiedades funcionales como capacidad de espumado, emulsión y gelificación de dichos concentrados de proteína de calamar, obtenidas bajo diferentes condiciones y/o tratamientos de congelación/molienda.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características Biológicas del Calamar

El calamar gigante *Dosidicus gigas* (D'Orbigny, 1835 en 1834-1847) es un molusco que pertenece a la clase Cephalopoda, orden Theuthida, familia Ommastrephidae (Nigmatullin *et al.*, 2001; ITIS, 2004). *D. gigas* (Figura 1) es una especie pelágica que habita las áreas de la plataforma continental. Esta especie se distribuye en el Océano Pacífico Oriental desde la frontera de México y los Estados Unidos hasta Chile (a 45 °S) y se encuentra desde la superficie hasta más de 1000 metros de profundidad, siendo más

abundante en zonas de surgencias, ricas en nutrientes, que sostienen especies que conforman su dieta básica (Nigmatullin *et al.*, 2001; Suda, 1973).

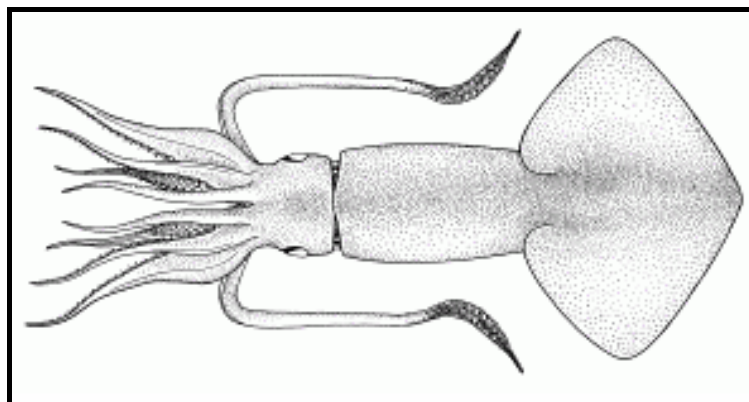


Figura 1- Calamar gigante (*Dosidicus gigas*). FAO, 2003.

Dosidicus gigas tiene un ciclo de vida corto de máximo dos años. Este organismo alcanza tallas de 87 cm de longitud de manto (LM) y peso máximo de 13 kg (Hernández, *et al.*, 1998). El calamar presenta migraciones horizontales denominadas “pasivas”, originadas por las corrientes de agua que mueven las masas de huevos, larvas o juveniles. La migración “activa” es el movimiento realizado por los adultos (Nigmatullin *et al.*, 2001), en este tipo de migración, puede nadar con sus brazos durante largos periodos. En el nado común sostenido o movimiento “de escape”, utiliza un sistema de propulsión a chorro y ondulado de aletas (Anderson y Demont, 2000). Esto lo logra llenando de agua la cavidad del manto y expulsándola a presión por el sifón. Este nado es invertido respecto a la anatomía del calamar: el manto es impulsado primero y los brazos flojos siguiendo al cuerpo, aunque el calamar es capaz de impulsarse en varias direcciones dirigiendo con sus músculos el chorro de agua (Anderson y Demont, 2000; de la Fuente, 2006).

La alimentación de *D. gigas* esta basada en una variedad de especies que habitan en los diferentes estratos de la columna oceánica incluyendo pequeños peces, crustáceos y moluscos (Markaida y Sosa, 2003). Las variaciones anuales del alimento explican, en parte, las fluctuaciones anuales del recurso calamar. La incidencia de canibalismo es de 26%, sin existir una correlación entre la talla de la presa y la del depredador (de la Fuente, 2006; Markaida y Sosa, 2003). Entre los depredadores del calamar se encuentran diferentes especies de escualos, túnidos y cetáceos (Jaquet y Gendron, 2002; FAO, 2003).

Se ha reportado que los calamares gigantes adultos realizan migraciones verticales subiendo en las horas nocturnas a la capa de agua entre 0 y 200 m, sumergiéndose durante el día a 800-1000 m o más; expuestos así dentro o justo por debajo de la capa mínima de oxígeno (Nigmatullin *et al.*, 2001; Salinas-Zavala (2007), comunicación personal). Son capaces de oscilar entre periodos sostenidos de metabolismo aerobio y anaerobio en función del ambiente o necesidades de movimiento y son capaces de tomar oxígeno a través de la piel; además de poseer un metabolismo que aprovecha eficientemente el oxígeno (Macgillivray, 1999; Nigmatullin *et al.*, 2001).

2.2 Anatomía y Estructura Muscular

Dentro de los calamares, *D. gigas* (Figura 1) se considera como un molusco de gran tamaño, robusto y de músculo grueso, características que lo proveen de fuerza para desplazamiento (FAO, 2003). Como se observa en la figura 2, el calamar posee un sifón, que es una estructura con forma de cono truncado por donde expulsa agua para desplazarse o bien para expulsar las heces, ubicado por debajo de la cabeza, rodeado de los tentáculos, en la zona ventral. Presenta además, dos tentáculos y ocho brazos, provistos en los

extremos de 100 a 200 pequeñas ventosas con garfio. Su cuerpo tiene forma de saco o manto cilíndrico que puede representar casi 45 % de peso corporal y envuelve la boca (pico), el sistema nervioso y los órganos. Posee dos branquias, cada una con su respectivo corazón más el corazón sistémico; lo cual le proporciona una maquinaria de bombeo. Está constituido por dos aletas musculares que forman un rombo; cuyo ancho equivale a cerca del 50% de la longitud del manto. (Instituto Nacional de la Pesca. 2006, FAO, 2003; de la Fuente, 2006).

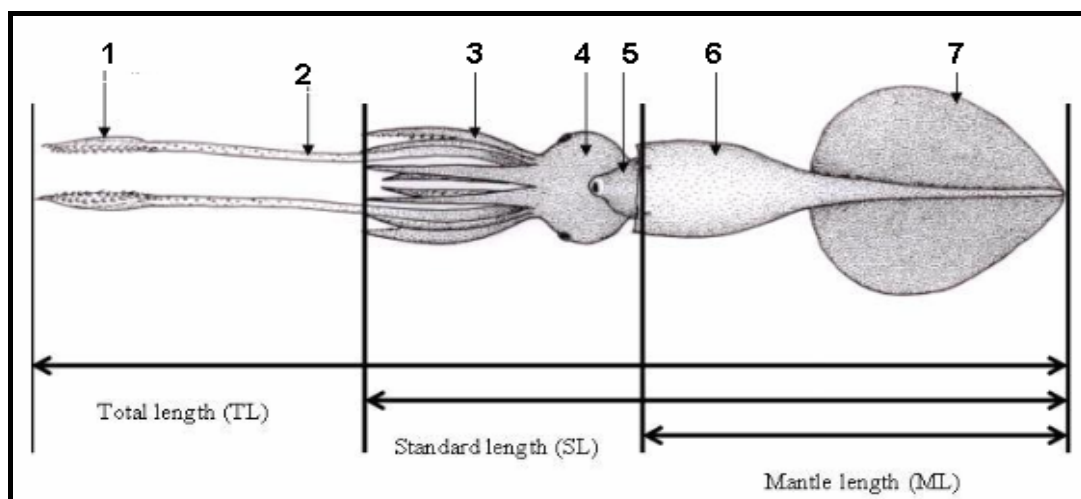


Fig. 2. Anatomía básica del calamar. (1) Extremo de tentáculo, (2) tentáculo, (3) brazos, (4) cabeza, (5) sifón, (6) manto y (7) aleta. Tomado de O'Shea, 2007.

Para el objetivo de este trabajo el interés se centra en el manto. En el manto se aprecian fibras musculares que muestran un arreglo circular y radial que están sostenidas por tejido conectivo con orientación circular, radial y longitudinal. Como se aprecia en la

Figura 3, la textura del manto de calamar se debe principalmente a dicho arreglo por capas de fibras (Melendo *et al.*, 1997).

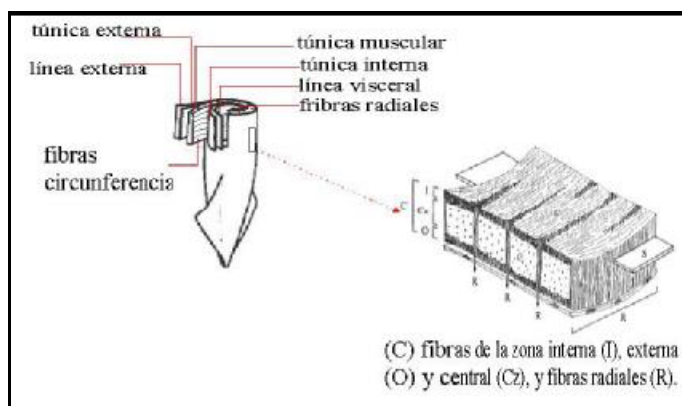


Fig. 3- Arreglo básico del músculo de calamar. Tomado de Melendo *et al.*, 1997.

El manto está compuesto por tejido muscular contenido entre dos capas de tejido conectivo. Las bandas musculares circunferenciales (espesor de 100 a 200 mm) se componen de fibras que corren alrededor de toda la circunferencia del cono del manto. Las bandas radiales (diámetro de 10 a 15 mm) están compuestas por fibras que se conectan a las dos capas de tejido conectivo. Todas las fibras musculares presentan células alargadas y delgadas (diámetro aproximado de 3.5 mm) que consisten en miofibrillas rodeando una sección central que contiene a las proteínas sarcoplásmicas, mitocondrias y al menos un núcleo; estas miofibrillas están enrolladas en una hélice izquierda (Llunch *et al.*, 2000, Kier y Thompson, 2003; de la Fuente, 2006).

2.3 Proteínas Musculares del Calamar

Como en todo músculo estructurado, las proteínas de calamar están clasificadas en proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y estroma. Las proteínas miofibrilares constituyen la mayoría de las proteínas musculares totales oscilando del 75 al 85%, siendo de las proteínas miofibrilares más representativas la miosina (cadena pesada de 220 kDa), actina (45 kDa) y paramiosina (111 kDa); La miosina es la proteína más importante de las miofibrilares, debido a que participa de manera crucial en la contracción muscular gracias a su actividad de ATPasa; además esta proteína ha sido de gran interés por sus aplicaciones en ciencia y tecnología de alimentos. Por otro lado, la paramiosina es característica de los músculos de invertebrados y para el caso de calamar esta puede representar cerca del 14% del total de las proteínas miofibrilares (Ruiz *et al.*, 2003; Konno *et al.*, 2003; Paredi y Crupkin, 1997; Sikorski y Kolodziejska, 1986).

En cuanto a la fracción de proteínas sarcoplásmicas, estas representan cerca del 15 % del total de proteína del calamar (Sikorski y Kolodziejska, 1986; Ruiz *et al.*, 2003; Ezquerro *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003). Una característica importante de la fracción de proteínas sarcoplásmicas es la actividad proteolítica que puede conducir a la degradación posmortem de las proteínas miofibrilares (Sikorski y Kolodziejska, 1986, Ezquerro *et al.*, 2002, Ruiz *et al.*, 2003); con la consecuente pérdida de los atributos de textura del músculo durante el almacenamiento o procesado.

Cabe mencionar, que las proporciones de las tres principales fracciones de proteínas musculares de calamar difieren de aquéllas reportadas para peces, especialmente el colágeno, que es el principal componente de las proteínas del estroma, el cual puede

constituir desde un 3 hasta un 11% del total de proteínas, comparado con el 2% para peces (Sikorski y Kolodziejska, 1986, Ezquerro *et al.*, 2002; Ruiz *et al.*, 2003).

2.4 La Pesquería de Calamar

Dosidicus gigas es un recurso marino explotado comercialmente en México desde hace décadas. La pesquería inicio en el Golfo de California en 1976, despuntó en 1980 con unas 20, 000 t de captura, las cuales disminuyeron drásticamente al año siguiente. Tras unos años con capturas limitadas a finales de los 80's, volvieron a incrementarse las capturas en 1994 y desde entonces se ha constituido en una de las principales pesquerías de México, con volúmenes de pesca de alrededor de 100, 000 t anuales (Markaida, 2005). En 1998 se da nuevamente una grave disminución de capturas, que se solucionó hasta marzo de 1999 (Jaquet y Gendron, 2002). Desde finales de 1999, con una captura de 57,985 t, el Instituto Nacional de Pesca considera al calamar como una pesquería con potencial de desarrollo (INP, 1999; FAO, 2003). Se trata, desde luego, de la mayor pesquería artesanal del país, y muy probablemente del mundo (Markaida, 2003). Por otro lado, se reporta que la disminución en las capturas está relacionado con migraciones, debido a su comportamiento migratorio a la presencia/ausencia de alimento (Salinas-Zavala, 2007, Comunicación personal; de la Fuente, 2006).

La pesca de este recurso tiene la ventaja de que no requiere mucha infraestructura y además no interfiere con la pesquería de otras especies. En el golfo de California la pesca se realiza artesanalmente desde una lancha donde operan dos pescadores. Durante la noche, la luz de un pequeño foco bajo la lancha atrae al calamar. Para capturarlo se emplea un arte de pesca llamado “potera” que consiste en una pieza de plástico ovoide con varias coronas

de anzuelos a la que el calamar se engancha al atacarla. La potera va unida a una línea que cada pescador maneja. Cada lancha puede sacar más de una tonelada de calamar en unas pocas horas. El calamar capturado se eviscera y entrega inmediatamente a las plantas procesadoras o a los compradores nacionales (Markaida, 2005).

2.5 Precio y Situación en el Mercado

A pesar de ser una pesquería con potencial y un negocio rentable, una de las principales problemáticas ha sido el bajo precio en el mercado interno y de exportación, debido a que solo se comercializa como músculo fresco, congelado o cocido, (Instituto Nacional de la Pesca. 2006; Reporte de Mercado de Calamar, 2004), lo cual convierte al calamar gigante *Dosiducus gigas*, una fuente de proteína, en un recurso pesquero gravemente subvaluado. Los precios que se pagan por el molusco son bajos, el manto por ejemplo se está pagando a US\$ 0.17/Kilo, la aleta a US\$ 0.30/Kilo que se vende para carnada que utiliza la flota tiburonera y la cabeza que se paga a US\$ 1.04/kilo. Con tales precios, cuando el recurso calamar llega a escasear, nadie sale a su captura, debido a que la inversión para habilitar un barco o una panga no es rentable, pues la captura no bastaría para cubrir la inversión realizada (Reporte de Mercado de Calamar, 2004; Markaida, 2005). También, existen lapsos en que los bajos volúmenes de captura de calamar obliga a mantener cerradas plantas procesadoras y solamente algunas pequeñas industrias compran manto para elaborar el calamar sazonado.

A pesar de lo anterior, solo cuando el recurso calamar es muy abundante, la pesca se vuelve rentable, incluso existiendo los precios bajos en el mercado; de tal forma, que la

única manera de que la pesca sea rentable para los productores primarios, es logrando capturar grandes volúmenes de calamar; al menos una tonelada de calamar por panga.

Tabla 1: Precios registrados para el calamar de exportación (Reporte de Mercado de Calamar, 2004)

Presentación/Calibres	Producto -Forma	Precio
12 kg/caja	Congelada - Cocido (Daruma)	USD 850/t.
Manto hasta 2 kg	Filetes congelados sin piel	USD 550/t.

Los precios del calamar y las presentaciones que se mencionan en la tabla 1 para exportación no han cambiado significativamente hasta la fecha. El principal destino de exportación es el mercado asiático, el cual reportó casi 18 millones de USD en 1997 el cual ha sido una de las cifras más altas en el historial de la pesquería (INP, 1999; Instituto Nacional de la Pesca. 2006 Reporte de Mercado de Calamar, 2004).

2.6 Procesamiento del Calamar

Los productores primarios y las plantas procesadoras son quienes separan las partes de interés comercial (cabeza, manto y aletas) y el único procesamiento comercialmente importante que se le ha dado al manto ha sido la cocción en filetes, para posteriormente ser enlatado en diferentes presentaciones y el resto de los mantos se congelan para ser enviados a Corea, principal mercado que promueve esta pesquería. La cabeza y las aletas se distribuyen a otros países; aunque la cabeza tiene mayor aceptación en el mercado interno. El consumo nacional no refleja el volumen de las capturas, debido a la baja demanda por

parte de los consumidores, aunque notablemente, ya se encuentra fresco o congelado en todos los mercados del país, incluso en el sureste (Markaida, 2005).

Hasta el momento, se han identificado varias de las razones por las cuales el recurso calamar gigante se encuentra subvaluado; siendo la principal, la falta de opciones tecnológicas viables o rentables para procesarlo. Algunos organismos federales como SAGARPA y CONACyT han abierto convocatorias demandando propuestas de investigación para procesarlo y obtener productos de mayor valor. Convocatorias que denotan el interés y la preocupación por aplicar nuevas estrategias para procesar el recurso, que finalmente ayude a hacer prosperar la industria pesquera.

Se han reportado esfuerzos significativos de investigación para aumentar el valor agregado del calamar. Algunos de los ejemplos más relevantes han sido los intentos por producir surimi de músculo de calamar gigante con el fin de maximizar su valor. El proceso de elaboración de surimi involucra el lavado del músculo y la adición de crioprotectantes para mantener estables a las proteínas durante la congelación. Sin embargo, para calamar los resultados reportados no fueron positivos, debido, según varios autores, a alta actividad enzimática endógena por proteasas presente en el músculo, que provoca la pérdida en la capacidad de formar geles (Ayensa *et al.*, 2002). Además, el proceso de lavado otorga bajos rendimientos puesto que la fracción miofibrilar es altamente soluble en agua (Sánchez *et al.*, 2007). Gómez *et al.* (1997) realizaron trabajos para favorecer la gelificación, utilizando ingredientes como almidón, huevo, o inhibidores de proteasas. Sin embargo, esto aumentó los costos de producción.

En otro trabajo, de la Fuente (2006) evaluó las propiedades funcionales tanto del músculo de calamar gigante como de los hidrolizados de proteína del mismo; generando información sobre posibles aplicaciones de las proteínas musculares en la industria de alimentos, sobre todo en la elaboración de productos tipo gel, y evidenció que adecuadas prácticas post-captura favorecen la estabilidad de las proteínas musculares. Rocha (2006) generó estudios comparativos de las propiedades funcionales como capacidad de formación de espuma, gelificación y solubilidad de músculo de manto y aleta bajo diferentes condiciones de pH y fuerza iónica. En ese trabajo se obtuvo información valiosa sobre las condiciones a las cuales pudieran procesarse y utilizarse las proteínas de calamar.

Por otro lado Sánchez Alonso *et al.* (2007) publicaron un método para la obtención de concentrados de proteína de músculo para elaborar productos tipo gel o surimi. En esta propuesta se utilizó un proceso de solubilización por fuerza iónica a pH neutro de las proteínas musculares donde luego estas proteínas son concentradas por precipitación a pH ácido (punto iso-eléctrico).

Con base a los antecedentes presentados, se abordó un trabajo de investigación en el que se evaluaron y compararon entre sí, dos procesos de solubilización a pH ácido y alcalino que ofrecen atractivas ventajas para la obtención de concentrados de proteína funcional. Dichos procesos y resultados de la investigación serán descritos y discutidos.

2.7 Uso Potencial de Proteínas Musculares de Calamar: Problemáticas e importancia

Las proteínas de origen marino son susceptibles a la degradación bacteriana y menos estables cuando se comparan con proteínas de mamíferos o vegetales, lo que resulta

en pérdida de funcionalidad durante el procesamiento; del tal forma que su uso como alimento y como ingrediente alimenticio ha sido limitado (Mackie, 1994; Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2003).

La proteína muscular de *Dosidicus gigas* no es la excepción. Aunado a esto, han existido otras razones que han limitado su consumo y procesamiento, como: 1) el calamar no se encuentra en la cultura culinaria de la población, 2) llega a presentar sabor amargo y olor amoniacal, 3) no hay tecnologías para elaborar productos de interés comercial y 4) inadecuado manejo post-captura. Una razón para esto último es el argumento sobre pobres propiedades funcionales debidas a una alta actividad proteolítica endógena (Ayensa *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2007).

Sin embargo, gracias a investigaciones realizadas en los últimos años por parte de varios grupos especializados en ciencia y tecnología de alimentos, que generaron líneas relacionadas con aspectos de fisiología, bioquímica postmortem y cambios estructurales en proteínas bajo diferentes condiciones de proceso y/o almacenamiento (Mackie, 1994; Gómez *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 1998; Ayensa *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2004; de la Fuente, 2006; Sánchez *et al.*, 2007), las proteínas del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) actualmente son consideradas nutritivas (de la Fuente, 2006), de alta digestibilidad (Gómez *et al.*, 2003) y con buena funcionalidad (Sánchez *et al.*, 2007); lo cual las hace deseables para una gran variedad de aplicaciones en la industria de alimentos. Cabe destacar que, el músculo de calamar manejado bajo buenas prácticas post-captura y almacenamiento, presenta baja o casi nula actividad proteolítica endógena (de la Fuente, 2006).

Actualmente existe gran interés en la búsqueda de nuevas especies como fuente redituable o rentable de proteínas musculares (Undeland y Kelleher, 2002), puesto que son de importancia para la industria alimentaria y los tecnólogos de alimentos, quienes buscan aumentar el uso de proteínas musculares como ingredientes en la formulación de alimentos, ya que dichas proteínas además de ser nutricias, presentan propiedades funcionales (Vojdani, 1996). Las propiedades funcionales o capacidad funcional, hace de ellas candidatas para elaborar productos con características organolépticas de interés en el mercado. Dichas propiedades funcionales están relacionadas con la capacidad de emulsificar lípidos, formación de espuma y la capacidad de formar geles (Xiong, 1997; Hultin y Kelleher, 1999).

En los últimos años, las proteínas musculares de origen marino han tenido un papel importante en la industria del surimi, en la elaboración de análogos de mariscos o en productos cárnicos basados en gelificación de proteínas. (Hultin, 2002; Undeland y Kelleher, 2002; Kristinsson y Liang, 2006; Sanchez *et al.*, 2007).

Varios métodos y estrategias han sido implementados para aislar o concentrar proteínas funcionales del músculo de especies marinas (Hultin, 2002). Recientemente están siendo preferidos métodos de procesamiento que se centran en mantener las propiedades funcionales de las proteínas musculares, (Ingadottir, 2004; Kristinsson y Liang, 2006). Dentro de dichos procesos se encuentran los métodos de elaboración de surimi y los métodos de solubilización ácida y alcalina, con los cuales es posible obtener concentrados proteicos de alto valor y con buena funcionalidad (Hultin y Kelleher, 1999; Hultin y

Kelleher, 2000; Hultin *et al.*, 2000; Hultin *et al.*, 2005; Kristinsson *et al.*, 2005; Kristinson y Liang, 2006).

El calamar gigante es la materia con potencial para ser utilizada en tecnología de alimentos, ya que bajo buenas prácticas post-captura, el músculo presenta características deseables como son: un alto contenido en proteína con adecuado balance de aminoácidos esenciales (de la Fuente, 2006), poco olor, color blanco (Sánchez *et al.*, 2007), y además, es un recurso abundante, con bajo valor en el mercado y existe presión por parte de los productores primarios por procesarlo y darle así un alto valor agregado. Es por ello que este trabajo se enfocó en estudiar dos métodos de procesamiento prometedores para darle valor agregado a esta especie, pero sobre todo, este trabajo de investigación ha pretendido aportar información en torno a esta especie la cual facilitará la forma de abordar una de las problemáticas de la pesquería: procesamiento y comercialización

2.8 Procesos de Solubilización a pH Ácido y Alcalino (*pH Shift Processing*)

Los procesos de solubilización de proteína a pH ácido y alcalino (*pH shift processing*), fueron desarrollados por Hultin *et al.* (1999 y 2000). Tales procesos son comúnmente conocidos como procesos de *pH shift* (pH shift processes), esto debido a que utilizan recambios de pH durante el desarrollo del proceso. Al proceso que implica la solubilización a pH ácido (pH 3.0) y precipitación a pH 5.5 de las proteínas musculares se le llama proceso ácido. Por otro lado, al proceso que implica la solubilización a pH alcalino (pH 11.0) y precipitación a pH 5.5 de las proteínas musculares se le llama proceso alcalino. Estos procesos son considerados estrategias tecnológicas que ofrecen importantes ventajas a la hora de utilizar materias primas de origen marino de bajo valor o poco atractivas para

ser procesadas. Dichos procesos han tenido fuerte relevancia en la producción de surimi y en el manejo de subproductos marinos, así como en la recuperación de concentrados de proteínas útiles en la elaboración de productos tipo gel, gel-emulsificado y surimi (Hultin y Kelleher, 1999; Hultin y Kelleher, 2000; Hultin *et al.*, 2000; Cortés *et al.*, 2001; Undeland *et al.*, 2002; Kristinsson *et al.*, 2005; Kristinson y Liang, 2006).

Como se describe en la figura 4, la producción de concentrados de proteína se basa en ajustar un homogenizado de músculo y agua a pH extremo, ácido (2.0 a 3.5) o alcalino (10.5 a 11.5), con el fin de que la mayor parte de las proteínas musculares se solubilizan vía repulsión electrostática. Como consecuencia del rompimiento celular y la solubilización de las proteínas, la viscosidad de la suspensión es drásticamente disminuida. El decremento de la viscosidad permite la separación de material insoluble (membranas, tejido conectivo, restos de hueso, piel e incluso lípidos) de las proteínas solubles por medio de centrifugación. Las proteínas solubles son recuperadas por precipitación isoelectrica (ajustando el pH de 5.0 a 6.0) para luego ser colectadas por centrifugación. Finalmente se logra la obtención de un concentrado de proteínas musculares.

De acuerdo a la literatura, diversas especies se han utilizado en la elaboración de geles partir de proteína recuperada por el método de pH-shift y han demostrado igual o mayor capacidad de gelificación que aquellos elaborados por el proceso convencional de surimi (Hultin y Kelleher, 2000; Cortés *et al.*, 2001; Undeland *et al.*, 2002; Choi y Park, 2002; Kristinsson y Demir, 2003). Además, el proceso ha demostrado que mejoran otras propiedades funcionales (Kristinsson y Hultin, 2003a) como emulsificación y gelificación de la miosina y en proteínas miofibrilares de bacalao (*Gadus morhua*). La mejora se relacionó directamente con el desplegamiento parcial único que presenta la miosina

después del tratamiento a pH alcalino. El proceso ha dado resultados excelentes para algunas especies de aguas frías como también para especies marinas de aguas templadas (Kristinsson y Demir, 2003).

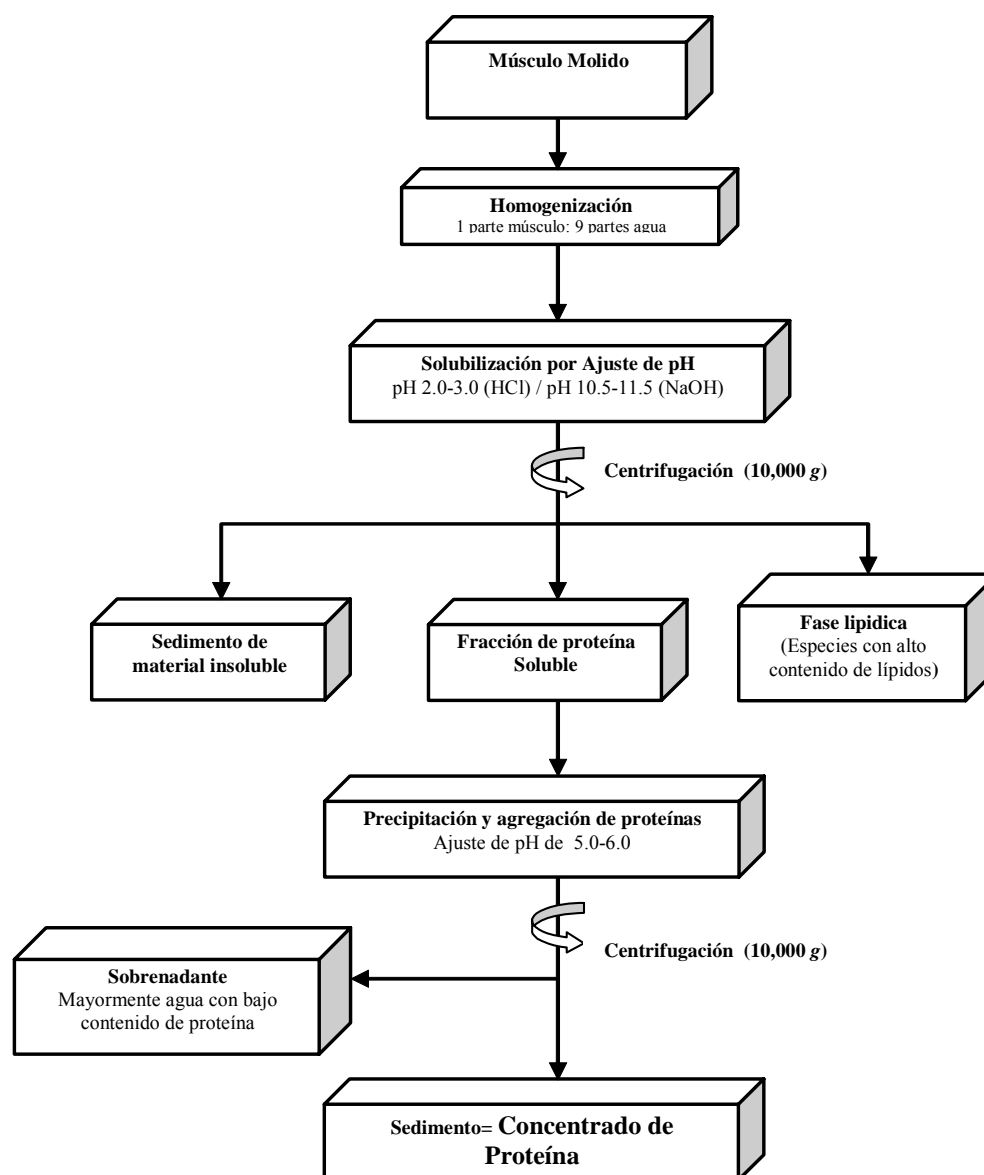


Figura 4 – Diagrama esquemático del proceso de solubilización ácida y alcalina para la obtención de concentrados de proteína.

El proceso de solubilización de proteína a pH ácido y alcalino puede rendir diferentes propiedades de la proteína recuperada dependiendo de si se utilizan especies de aguas templadas o de aguas frías. Un estudio realizado en actomiosina en *Nemipterus bleekeri* (threadfin bream o “falso pargo”) indicó que la agregación de proteínas se llevo a cabo a temperaturas más altas cuando se comparó con proteína de especies de agua frías como el bacalao (*Gadus morhua*) y la merluza (*Merluccius productus*) (Yongsawatdigu y Park, 2003). Varios estudios realizados por la Universidad de Florida han mostrado que varias especies de aguas calidas tienen gran potencial para ser utilizadas bajo los procesos ácido y alcalino. En un trabajo realizado por Kristinson y Demir (2003) compararon el proceso a pH ácido y alcalino con el proceso convencional de surimi en diferentes especies de pescados y demostraron que ambos procesos de solubilización resultaban en mayor recuperación de proteína y reducción de lípidos que el proceso de surimi en laboratorio, a su vez el proceso de solubilización alcalina resultó en una mejora significativa de la capacidad de gelificación, color y estabilidad a la oxidación (debido a la remoción de proteínas hemo) comparada con el proceso de solubilización acida y el proceso de surimi.

Theodore *et al.* (2003) demostraron que usando el proceso de solubilización alcalina en músculo de bagre (*Ictalurus punctatus*) es posible generar geles con mayor fuerza que el proceso de solubilización acida y el proceso convencional de surimi dentro de un amplio rango de pH (6.0-8.0) y fuerza iónica (0-600 mM NaCl). Estos resultados fueron apoyados por los generados por Davenport y Kristinsson (2003) quienes indicaron que existen ciertos cambios en la miosina (de músculo de bagre) después de exponerse a pH alcalino los cuales contribuyen a mejorar la fuerza de gel. Mas estudios sobre este fenómeno realizados por

Kristinsson y Crynen (2003) demostraron que tanto las proteínas miofibrilares como sarcoplásmicas en músculo de bagre (*Ictalurus punctatus*) son afectadas positivamente en términos de capacidad de gelificación después de exponerse a pH alcalino, pero, resultan afectadas negativamente después de la solubilización ácida. El fenómeno molecular responsable de estas diferencias aún se encuentra bajo discusión.

Se tienen evidencias (Kristinsson y Hultin, 2003b; Thawornchinsombut y Park, 2004; Yongsawatdigul y Park, 2004) de que las proteínas experimentan formación de enlaces disulfuros y pérdida de grupos sulfhídricos durante la solubilización alcalina, lo cual también está relacionado con el aumento de la fuerza y dureza de los geles. A la fecha los estudios sobre cambios conformacionales que sufren las proteínas a dichos pH's aún se encuentran bajo intensa investigación.

Para el caso de *D. gigas*, se desconoce como pudieran ser afectadas las proteínas musculares bajo condiciones de solubilización a pH ácido y alcalino, para ello deberán de evaluarse para poder proponer cualquier proceso para recuperar y aprovechar su proteína, así como también mejorar las propiedades funcionales de las proteínas de calamar.

Ventajas de los procesos de pH *shift* en comparación al proceso convencional de surimi:

- Utilizando los procesos ácido y alcalino la recuperación de proteínas es significativamente mayor (>70%) debido a que se recuperan las proteínas miofibrilares y parte de las sarcoplásmicas. Por métodos convencionales la recuperación es menor debido a la pérdida de proteínas sarcoplásmicas (30-50% Aprox.) durante los lavados (Hultin y Kellerher, 1999, Hultin y Kellerher, 2000, Hultin *et al.*, 2000).

- Los procesos ácido y alcalino son métodos simples y requieren de menos trabajo que el proceso de surimi. (Hultin, 2002; Hultin *et al.*, 2005)
- El pescado completo con piel, huesos y lípidos puede ser utilizado directamente como materia prima, ya que con los procesos de ácido y alcalino las proteínas de interés pueden ser separadas y recolectadas selectivamente de los componentes indeseables del músculo. Esto no sería tan fácil en el proceso convencional de surimi (Hultin, 2002).
- Lípidos y membranas celulares pueden ser efectivamente removidas en el proceso alcalino. Esto, significativamente mejora el color y aumenta la estabilidad a la oxidación de los productos finales comparadas con las proteínas obtenidas por el proceso de surimi. Además los microorganismos son efectivamente sedimentados durante la primera centrifugación (Liang y Hultin, 2005)
- Las propiedades funcionales también son retenidas, disminuidas (en algunos casos en el proceso ácido) o significativamente mejoradas (proceso alcalino) usando los procesos de pH *shift*. El efecto sobre la funcionalidad es altamente dependiente de la especie y del tipo de propiedad funcional (Kristinsson y Hultin, 2003a; Theodore *et al.*, 2003; Kristinsson y Demir, 2003)
- Diversas reacciones indeseables que se generan durante el procesamiento (Ej. hidrólisis enzimática por enzimas endógenas del músculo o por enzimas microbianas) de músculo de especies marinas, son reducidas o inhibidas en los procesos ácido y alcalino debido a los tiempos tan cortos, y a los valores de pH

extremos que se utilizan y las bajas temperaturas requeridas en el proceso (Hultin, 2002).

Con base a los antecedentes expuestos, al implementar los procesos de solubilización ácida y alcalina sobre proteínas musculares, es posible encontrar diferentes respuestas entre ellos e incluso entre especies. Por lo tanto, en vista de que el músculo de calamar gigante es la materia prima a procesarse, en este trabajo se tuvo la inquietud de hacer una comparación entre ambos procesos de recuperación de proteína con el fin de discutir o evaluar las posibles diferencias y/o ventajas que presenten los mismos; de tal forma, que eso nos daría un acercamiento sobre si dichos procesos son viables para implementarse comercialmente en el futuro.

2.9 Propiedades Funcionales de las Proteínas Musculares

Las proteínas no solo son fuente de aminoácidos sino que, debido a su naturaleza polimérica influyen en las características reológicas y de textura de un alimento, que hacen que éste sea aceptado por el consumidor (Badui, 1999). En términos generales, las propiedades funcionales se definen como “cualquier propiedad fisicoquímica de los polímeros que afecta y modifica algunas características de un alimento y que contribuye a la calidad final del producto” o bien “como cualquier propiedad de un alimento o ingrediente, excepto la nutricional, que influya en su utilización para obtener un producto deseado” (Pour-El, 1981; Smith, 1987; Hall, 1996). Por ejemplo, propiedades funcionales son la hidratación, el espumado, la emulsificación y la gelificación, los cuales dependen fundamentalmente de factores intrínsecos propios de la molécula (conformación, relación y disposición de aminoácidos, hidrofobicidad, ionización, carga eléctrica, forma, peso

molecular, etc.), así como de factores extrínsecos del medio que los rodea y que en ocasiones pueden modificarse como lo son pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, etc. (Pour-El, 1981; Hall, 1996; Belitz *et al.*, 2004).

El grado de funcionalidad de una proteína muscular dependerá primeramente de la composición de su estructura primaria (secuencia de aminoácidos), la naturaleza de los residuos en la cadena lateral (polar, no polar, carga positiva o negativa), la proporción de cada clase de aminoácidos y su distribución a lo largo de la cadena, lo cual determinará la capacidad de solubilidad, hidrofobicidad de superficie y la capacidad de estabilizar espumas, emulsiones y geles. Además, el tamaño y naturaleza de las cadenas laterales determina la estructura secundaria y terciaria, y las posibles interacciones con el medio. Por lo tanto, la estructura, tamaño, distribución y balance de tipos de aminoácidos definirá la funcionalidad de una proteína. Las proteínas musculares, miosina y actina son las principales moléculas responsables de las propiedades funcionales (Feng y Hultin, 1997; Hultin, 1999; Undeland *et al.*, 2002; de la Fuente, 2006).

Es sabido que la calidad y estabilidad del producto final son afectadas por las propiedades funcionales de las proteínas (Xiong, 2000). Las propiedades funcionales de mayor interés, cuando se requiere producir un concentrado de proteína funcional para ser utilizado en alimentos, se encuentran la solubilidad, emulsificación y gelificación (Hultin y Kelleher, 1999); así como viscosidad, retención de agua y espumado.

La solubilidad de las proteínas, es la concentración de proteína presente o ligada en el solvente en un estado de equilibrio en la fase líquida. Vista en parte como un parámetro operacional de un proceso, la solubilidad es determinada por la retención de proteína en el sobrenadante obtenido después de centrifugar un sistema de una o dos fases. (Hall, 1996;

Vojdani, 1996). Esta es de gran importancia por su influencia sobre otras propiedades funcionales como la formación de emulsión, de espuma y gelificación (Vojdani, 1996; Belitz *et al.*, 2004).

Un cambio en la solubilidad de las proteínas puede ser obtenido en varias maneras, como por ejemplo, variando la fuerza iónica, tipos de iones, pH y/o temperatura y así afectando la naturaleza hidrófoba o iónica de las proteínas. Por mucho tiempo se mantuvo la idea de que era necesario solubilizar las proteínas miofibrilares a alta concentración de sales (0.3 a 0.6 M) para poder formar buenos geles de pescado (Ingadottir, 2004). Sin embargo, estudios han demostrado que no se necesita alta fuerza iónica para lograrlo; Stefansson y Hultin (1994) evidenciaron, que las proteínas musculares de bacalao eran solubilizadas si la fuerza iónica era suficientemente reducida (<0.3 mM) en un ambiente de pH neutro. Ellos argumentan que dentro de una solución acuosa con baja fuerza iónica, las fuerzas de repulsión de las cadenas laterales cargadas negativamente eran suficientes para separar a las proteínas individuales una de otra cuando había suficiente cantidad de agua en el medio.

Actualmente también se sabe que cambios en la solubilidad de proteínas también pueden ser obtenidos variando el pH de la solución; tal es el caso de los procesos ácido y alcalino. Cambiando el pH, las proteínas adquieren una carga neta negativa o positiva donde resultara en una repulsión entre ellas y una hidratación de los residuos cargados, provocando así, un incremento de la solubilidad (Damodaran, 1996; Yongsawatdigul y Park, 2004). Por debajo del punto iso-eléctrico (pI) las proteínas presentaran carga positiva y por arriba de este tendrán carga neta negativa. En el momento en que el pH es ajustado cerca del pI se reducirán las fuerzas de repulsión y permitirán que se agreguen entre ellas

(Yongsawatdigul y Park 2004; Ingadottir, 2004; Kristinsson y Liang, 2006) Por lo tanto, muchas proteínas exhiben mínima solubilidad en su punto iso-eléctrico donde la disminución de las fuerzas de repulsión electrostática promueve que las moléculas de proteínas se asocien y/o agreguen. Así, la agregación de proteínas a estas condiciones permitirá que estas sean separadas o removidas de la solución por medio de una adecuada centrifugación (Hultin *et al.*, 2000; Hultin y Kelleher, 1999).

Una de las principales propiedades requeridas en muchos sistemas de elaboración de alimentos es la capacidad de formar emulsiones. La emulsión, es definida como una dispersión o suspensión de dos líquidos inmiscibles, donde existirá una fase dispersa y una continua. Las emulsiones son estabilizadas por emulsificadores, los cuales son compuestos capaces de formar filmes en la interfase, lo que previene que las fases dispersas se unan entre sí. Las emulsiones en alimentos pueden ser agua en aceite, como las mantequillas; o aceite en agua, como la leche. En muchos sistemas alimentarios, los sólidos juegan un papel importante y frecuentemente se encuentran presentes espuma y emulsión. Una emulsión es intrínsecamente inestable y con el tiempo las gotas de la fase dispersa tenderán a atraerse y poco a poco se romperá la emulsión llegando a la separación de fases. La estabilidad de una emulsión depende del tamaño y posición de las partículas sólidas, además de las fuerzas asociadas con la interfase de aceite y agua (Hill, 1996; Belitz *et al.*, 2004).

Por otra parte, la capacidad de formación de espuma juega un papel importante en una enorme variedad de aplicaciones en elaboración de merengues, mousses y similares, productos batidos y en cerveza. La capacidad de formación de espuma se da por el carácter anfipático (hidrofílico y apolar/hidrofóbico) de las proteínas, que les permite su adsorción

en interfases (aire en una fase continua). La función de las proteínas es reducir la tensión interfacial orientando sus grupos hidrófilos hacia el exterior de la burbuja, en contacto con el agua, y los hidrófobos hacia el interior, en contacto con el aire donde en ciertas ocasiones la capacidad mantener estables estos sistemas se vuelve aun más importante que generar el mismo (Wilde y Clark, 1996).

Una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas es su capacidad de formar geles después de someterlas a calentamiento. Un gel es un estado intermedio entre sólido y líquido donde los polímeros (proteínas) forman una red tridimensional que es capaz de retener agua y otros compuestos de bajo peso molecular (Damodaran, 1996). Las características de los geles de proteína están determinadas por el tipo y número de interacciones de proteína-proteína, agregación y arreglo de las proteínas desplegadas o desnaturalizadas, que esto a su vez es afectado por el pH, fuerza iónica, concentración de proteína y grado de calentamiento o enfriamiento (Xiong y Blacnchard, 1994). La gelificación puede ser definida también como un fenómeno de agregación de proteínas desnaturalizadas, en el cual se da un balance entre fuerzas de repulsiones y atracciones hidrofóbicas e hidrofílicas, formando una red tridimensional ordenada y porosa capaz de retener agua. Si se da una agregación de proteínas de forma irregular, se forman coágulos; si no existe un balance adecuado de interacciones entre proteínas, no se formará un gel (Matsumura y Mori, 1996; Belitz *et al.*, 2004).

2.10 Desnaturalización de Proteínas

Es común que se tenga la visión de que la desnaturalización de las proteínas musculares de pescado y otras especies tiene un impacto perjudicial sobre las propiedades

funcionales. La desnaturalización frecuentemente resulta en cambios negativos en la funcionalidad de proteínas, tal es el caso de la actividad enzimática que se refleja en pérdida de las propiedades funcionales (Vissessanguan y An, 2000). Sin embargo, en otros casos, a pesar de la desnaturalización de las proteínas, estas pueden conservar propiedades funcionales o incluso mejorarlas, como la formación de espuma y la emulsificación (Ingadottir y Kristinsson, 2003) o la gelificación. La pérdida de funcionalidad puede ser correlacionada con la pérdida de la actividad ATPasa, lo cual es un común indicador de la desnaturalización de las proteínas musculares (Xiong, 1997) pero, la actividad ATPasa es esencialmente perdida en los procesos de *pH shift* donde las proteínas son parcialmente desnaturalizadas a alto y bajo pH para luego ser nuevamente plegadas parcialmente al reajustar el pH (Kristinsson y Hultin, 2003b). El hecho de que las proteínas tratadas a pH ácido y alcalino frecuentemente conserven o mejoren sus propiedades funcionales va en contra de lo que debiera esperarse. Kristinsson y Hultin (2003b) demostraron que la estructura única que poseen las proteínas después de tratamiento de pH es responsable de mejorar las propiedades de gelificación, emulsificación y solubilidad. Por ejemplo, la estructura parcialmente desplegada/plegada es más flexible y es capaz de formar mejores sistemas entrecruzados a altas temperaturas (gelificación) y fijarse mejor a interfases y disminuir la tensión superficial (emulsificación).

Ya se ha demostrado que el proceso ácido tiene diferente efecto sobre las estructuras de proteínas musculares comparado con el proceso alcalino (Davenport y Kristinsson, 2003; Kristinsson y Hultin, 2003a). Por lo tanto es importante el entendimiento de cual o cuales son los cambios específicos que ocurren en las proteínas durante dichos

procesos, de tal manera que permita optimizar la funcionalidad de estas proteínas según se requiera.

III. HIPÓTESIS

Utilizando el proceso de solubilización de proteínas a pH ácido y/o alcalino es posible la recuperación de proteínas con propiedades funcionales a partir de músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) sometido a diferentes tratamientos de congelación/molienda sin existir diferencias significativas entre los rendimientos de ambos procesos ni entre la funcionalidad de los concentrados de proteína obtenidos.

IV. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Evaluar a los procesos ácido y alcalino respecto a su eficiencia en la obtención de concentrados de proteína funcional a partir de músculo de manto de calamar gigante *Dosidicus gigas* sometido a diferentes tratamientos previos de preparación y almacenamiento.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el pH al que las proteínas del músculo de calamar gigante *Dosidicus gigas* (bajo diferentes tratamientos) presentan alta y baja solubilidad.

- Evaluar el rendimiento en la recuperación de proteína en los procesos ácido y alcalino y generar tablas de solubilización y recuperación de proteína de músculo de calamar sometido a diferentes tratamientos.
- Determinar por electroforesis SDS-PAGE el patrón de proteínas recuperadas en cada una de las etapas del proceso ácido y alcalino, así como identificar a las proteínas musculares de interés funcional.
- Evaluar las propiedades funcionales (formación y estabilidad de espuma, capacidad y estabilidad de emulsión, capacidad de formación de geles) de los concentrados de proteína obtenidos del músculo de calamar con diferentes tratamientos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Preparación de la Materia Prima

Se utilizaron 2 diferentes lotes de manto de calamar, los cuales fueron obtenidos de calamar capturado en Santa Rosalía, Baja California Sur, México (Julio 2005 y Noviembre 2006). En el momento de la captura, cada una de las muestras fue lavada y transportada en bolsas colocadas entre “camas” de hielo dentro de hieleras para asegurar que el músculo se mantuviera entre 0 y 1 °C durante todo el viaje hasta llegar al laboratorio de bioquímica del CIBNOR ubicado en La Paz, B.C.S., México. En todas las muestras se utilizó solamente el manto, ya que la piel y el tejido conectivo de capa delgada en la superficie del músculo fueron removidos manualmente y descartados.

Se emplearon lotes de músculo de calamar sometidos a diferentes tratamientos antes de ser utilizados en los procesos de *pH shift* con el fin de observar posibles efectos sobre la

recuperación y funcionalidad de los concentrados de proteína. Los tratamientos de preparación a los cuales fue sometido el músculo de calamar fueron los siguientes:

Proteína de Calamar Congelada-Molida-Congelada (CMC)

El manto de calamar obtenido en 2005 se almacenó congelado en filetes durante casi un año, donde posteriormente estos fueron picados en trozos de 1 a 2 cm² y luego molidos en un molino Retsch Brinkmann (Brinkman Instrumnets, Los Angeles, CA.) equipado con tamiz de 2 mm, generándose una pasta fría (1-3°C) que luego fue congelada nuevamente y almacenada en bolsas cerradas a -30°C durante varios meses.

Proteína de Calamar Molido y Congelado (MC)

Una porción de los mantos de calamar capturado en 2006 no fueron congelados antes de molerse (calamar fresco), se picaron y molieron de la misma manera que la muestra de 2005, posteriormente la pasta fue congelada y almacenada en pequeñas bolsas a -30°C durante varios meses.

Proteína de Calamar Congelado y Molido (CM)

Otra porción del manto de calamar capturado en 2006, al llegar al laboratorio, fue congelado en filetes y almacenado en bolsas cerradas a -30°C durante varios meses. Posteriormente estos fueron picados en trozos de 1 a 2 cm² y luego molidos en un molino Retsch Brinkmann (Brinkman Instrumnets, Los Angeles, CA.) equipado con un tamiz de 2 mm, generándose una pasta fría (1-3°C) que luego fue empleada inmediatamente en las evaluaciones.

Proteína de Calamar Molida (M)

Otra porción más de calamar fresco capturado en 2006 fue picado y molido, igual que en los procesos anteriores, y mantenido en bolsas cerradas sobre hielo dentro de un cuarto frío, asegurándose de tener la muestra entre 0 y 1°C para las evaluaciones inmediatas.

Toda la preparación de la materia prima y de las muestras fue realizada en un cuarto frío o sobre hielo para asegurar que la temperatura se mantuviera siempre por debajo de los 4°C. Para todos los casos se prepararon lotes de músculo molido compuesto de porciones de manto de 12 organismos en promedio.

5.2 Preparación del Homogenizado de Músculo

En todos los casos se utilizó músculo molido de los diferentes tratamientos. El músculo molido fue mezclado con agua destilada fría (4°C) en una relación 1:10, (músculo: agua) y homogenizado por 20 segundos (dos pulsos de 10 segundos) en una licuadora Oizter (Waring Products Division, Hartford , CT), se evitó la menor formación de espuma posible. El homogenizado generado fue vertido cuidadosamente en un envase colocado en hielo y después ajustado al pH apropiado utilizando un potenciómetro Hanna (pH meter HI 98230, Hanna Instruments, Romania) agregando HCl 2N ó NaOH 2N según sea el caso, y empleándose un agitador magnético S46415 Barnstead (Barnstead/Thermilyne, Dubuque, USA). En todos los casos se aseguró que la temperatura no se elevara por encima de los 5°C.

5.3 Solubilidad de las Proteínas Musculares

5.3.1 Curva de solubilidad

Dos sistemas de homogenizados fueron preparados a partir de la misma materia prima. El primer sistema (rango ácido, pH 6-2) de homogenizado fue ajustado del pH inicial del músculo con agua (6.2-6.5) hasta pH 2.0 adicionando HCl 2N en agitación moderada. El segundo sistema (rango alcalino, pH 7-12) de homogenizado fue ajustado del pH inicial del músculo con agua hasta pH 12.0 adicionando NaOH 2N. Al ir ajustando los valores de pH, se fueron tomando muestras de 1ml en cada punto de pH para los dos sistemas (ácido y alcalino). Se centrifugaron a 10,000 g por 20 minutos usando una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany) para separar la proteína insoluble de la soluble. La cantidad de la proteína soluble fue determinada empleando el método de Biuret (Torten y Whitaker, 1964) utilizando una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas modelo Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La concentración de proteína fue estimada usando una curva estándar ($R^2= 0.9945$) preparada con albúmina bovina en un rango de 1 a 10 mg/ml. La curva de solubilidad se construyo graficando los valores de pH 2, 2.5, 3, 4, 5, 5.5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 11.5 y 12. Por otra parte, cada una de las muestras fue analizada por SDS-PAGE según la metodología de Laemmli (1970) explicada mas adelante (sección 5.5).

5.3.2 Solubilidad Antes de la 1^{ra} Centrifugación (Etapa de Solubilización)

Utilizando los datos de la curva de la solubilidad previamente construida, se seleccionaron los valores de pH de mayor solubilidad (pH 3.0 y 11.0) y el de menor solubilidad (5.5) para ser estudiados más detalladamente.

Una vez conocidos los valores de pH de mayor y menor solubilidad se prepararon dos homogenizados a partir de la misma materia prima, ambos fueron ajustados del pH inicial del músculo con agua (6.2-6.5) hasta el valor de pH 3.0 ó pH 11.0 adicionando HCl 2N ó NaOH 2N en agitación moderada para el ácido y el alcalino respectivamente. Después de la solubilización de las proteínas, se llevó a cabo una primera centrifugación a 10,000 *g* por 20 minutos empleando una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany) para separar la proteína insoluble de la soluble. Todo el procedimiento se mantuvo entre 1-4°C. La concentración de proteína soluble fue determinada tomando una muestra de 0.5 ml del sobrenadante después de la centrifugación y empleando el método de Biuret (Torten y Whitaker 1964). Cada una de las muestras fue analizada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

5.3.3 Contenido de Proteína en el Homogenizado Inicial

La proteína inicial de ambos homogenizados (el de pH 3.0 y el de pH 11.0) antes de la 1^{ra} centrifugación fue evaluada de acuerdo a la metodología para proteína total inicial de Kristinson y Liang (2006) la cual consiste en tomar una muestra de 1ml antes de la centrifugación para diluirla 3 veces con agua destilada fría a pH 3.0 o pH 11.0 (según sea el caso) con el objetivo de mejorar la solubilización. Posteriormente las muestras se homogenizaron por 10 segundos utilizando un homogenizador manual de tejidos marca

Tearor (productos de Biospec, inc., Bartlesville) para posteriormente determinar concentración de proteína usando el método de Biuret (Torten y Whitaker 1964). Adicionalmente cada muestra se analizó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

5.3.4 Solubilidad después de la Precipitación Isoeléctrica (Etapa de Precipitación)

El sobrenadante resultante de la 1^{ra} centrifugación, conteniendo las proteínas solubles, fue recuperado en otro recipiente. Después esta solución fue llevada a pH de mínima solubilidad (pH 5.5) para precipitar las proteínas y luego someterlas a una segunda centrifugación a 10,000 g por 20 minutos empleando una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany). Durante todo el procedimiento la muestra se mantuvo entre 1-4°C. La proteína soluble remanente en el sobrenadante después de la 2^{da} centrifugación fue determinada tomando una muestra de 1 ml y analizada para cuantificar contenido de proteína usando el método de Biuret (Torten y Whitaker, 1964). Las fracciones del sobrenadante y del sedimento (concentrado de proteína) fueron analizadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

5.4 Cálculos de Porcentaje de Solubilidad

Los cálculos de solubilidad y rendimientos en las etapas de los procesos ácido y alcalino se determinaron de acuerdo a las siguientes formulas, cuyas variables se explican en el esquema 1:

- Proteína recuperada después de la 1^{era} centrifugación (etapa de solubilización):

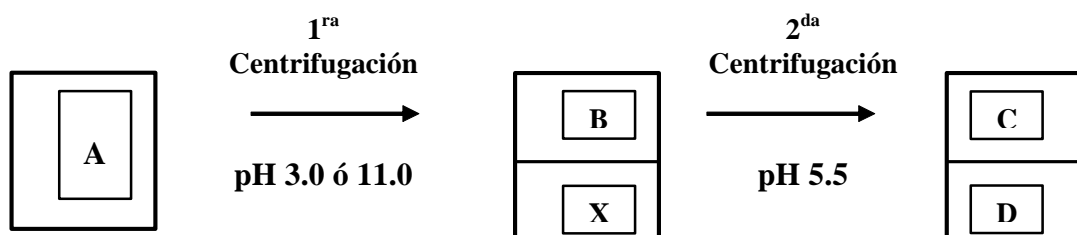
$$\% \text{ Proteina} = \left(\frac{A}{B} * 100 \right)$$

- Proteína recuperada después de la 2^{da} centrifugación (etapa de precipitación):

$$\% \text{ Proteína} = 100 - \left(\frac{C}{B} * 100 \right)$$

- Proteína recuperada a través de todo el proceso (recuperación total de proteína):

$$\% \text{ Proteína D} = \left(\frac{B - C}{A} * 100 \right)$$



Esquema 1.- A: Proteína en el homogenizado inicial, B: Proteína soluble en el sobrenadante después de la 1^{era} centrifugación, C: Proteína soluble en el sobrenadante después de la 2^{da} centrifugación, X: Tejido o proteínas no solubles (descartada del proceso), D: Concentrado de proteína.

5.5 Perfil de Proteínas por SDS-PAGE.

Las muestras de proteínas seleccionadas durante los experimentos anteriores fueron analizadas por medio de electroforesis en condiciones desnaturizantes reductoras y no reductoras SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Para determinar polimerización de las cabezas pesadas de miosina, se procedió a tratar a las muestras con y sin DTT como agente reductor. Se utilizaron geles compuestos por un gel concentrador de 4% y un gel separador

de 10%. En todos los casos, los geles tuvieron 1.5 mm de espesor. Las muestras, conteniendo 20 µg de proteína fueron mezcladas 1:1 con buffer de carga. En el caso de condiciones reductoras, el buffer de carga contenía ditioneitol (DTT) como agente reductor, después se mantuvieron en un baño María en ebullición por 5 minutos. Para el caso de las condiciones no reductoras, las muestras fueron mezcladas con un buffer de carga sin DTT y no fueron sometidas a baño María. La electroforesis se desarrolló en una unidad vertical (Hoefler, Inc, modelo SE 260), a corriente constante (30 mA por gel). Se utilizaron dos estándares de peso molecular: de 14 a 97 kDa (17-0615-01) y de 53 a 220 kDa (17-0446-01, GE Healthcare Bio-Sciences Corp.). Las bandas de proteínas fueron “reveladas” tiñéndolas con una solución de azul brillante de Coomassie R-250. El exceso de tinción se eliminó con una solución desteñidora (metanol 40%; ácido acético 7%). Se obtuvieron imágenes de los geles utilizando un escáner modelo UMAX 2100XL (Power Look, Taiwán).

5.6 Obtención de los Concentrados de Proteína

Se utilizó el proceso desarrollado por Hultin y Kelleher (2002) representado en la figura 4 con algunas modificaciones. Durante el desarrollo del proceso todo el sistema se mantuvo a temperaturas entre 2 y 4° C. Se utilizaron los lotes de músculo de calamar molido con los diferentes tratamientos descritos con anterioridad.

En este momento, al proceso que implica la solubilización ácida (pH 3.0) y precipitación a pH 5.5 de las proteínas musculares se le llamara proceso ácido. Por otro

lado, al proceso que implica la solubilización alcalina (pH 11.0) y precipitación a pH 5.5 de las proteínas musculares se le llamará proceso alcalino.

Primeramente, el músculo fue homogenizado con agua destilada fría (Aprox. 4°C). El pH del homogenizado fue ajustado al pH de mayor solubilidad observada (pH 3.0, solubilización ácida) y (11.0, solubilización alcalina) adicionando HCl 2N o NaOH 2N respectivamente. Cada uno de los homogenizados fue sometido a una primera centrifugación a 10,000 g por 20 minutos en una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany) para separar la proteína insoluble de la soluble. El sobrenadante tanto del proceso ácido como del alcalino fue ajustado al pH donde se observó la menor solubilidad (pH 5.5) para lograr la precipitación y agregación de las proteínas. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación a 10,000 g por 20 minutos para sedimentar y recuperar el concentrado de proteína funcional. Dichos concentrados de proteína fueron centrifugados de nuevo para ajustarlos a una humedad de 85% aproximadamente. Finalmente fueron pesados y registrados para calcular el rendimiento en base a materia prima utilizada. La humedad se determinó tomando 0.5g de concentrado de proteína y se secó en un analizador de humedad digital modelo Precisa XM60 (Precisa Instruments Ltd, Switzerland, Suiza), hasta tener peso constante.

Los concentrados de proteína obtenidos del proceso ácido y el proceso alcalino fueron neutralizados antes de evaluar sus propiedades funcionales. Esto se hizo adicionando NaOH 2N. El pH se monitoreó usando un potenciómetro Hanna (pH meter HI 98230, Hanna Instruments, Romania) equipado con un electrodo de inserción. La temperatura se mantuvo alrededor de los 3 °C.

5.7 Propiedades Funcionales

5.7.1 Emulsión

La capacidad de emulsión fue determinada utilizando el método de Swift (en Hill, 1996). Se preparó una mezcla de proteína (concentrado de proteína neutralizado), agua y aceite dando una proporción de 0.3% de proteína y 15.5% de aceite vegetal. El agua destilada usada en el método se ajustó previamente a pH 7.2. Finalmente el pH de la mezcla de emulsión osciló entre 7.2 y 7.4. Posteriormente el sistema fue agitado a temperatura ambiente con un homogenizador (LFE Corporation, Illinois, USA) utilizando un impulsor de propela a máxima velocidad durante 30 segundos. Luego se llevó a centrifugar a 5000 g por 5 minutos en una centrifuga Eppendorf 5804R (Brinkman Instruments Inc., Hamburg, Germany). El volumen generado por la emulsión se registró para cada muestra. La capacidad de emulsión se calculó como la relación de volumen de la emulsión formada respecto al volumen total inicial de la mezcla. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico (80 °C por 30 minutos) o bien dejándolas reposar 48 horas en refrigeración (5°C). El volumen de emulsión remanente fue registrado. La estabilidad de emulsión se expresó como el porcentaje de la capacidad de emulsión después del tratamiento térmico y/o almacenamiento en frío.

5.7.2 Espumado

La formación de espuma y su estabilidad fue determinada utilizando una modificación al método de Rudin (Wilde y Clark, 1996). Este método consistió básicamente en preparar una solución al 3% de proteína (concentrado de proteína neutralizado) agitada/batida durante un minuto a temperatura ambiente con un

homogenizador (LFE Corporation, Illinois, USA) provisto de un impulsor de propela para incorporar aire a la mezcla. El agua destilada usada en el método se ajustó previamente a pH 7.2. Finalmente el pH de la mezcla osciló entre 7.2 y 7.3. La capacidad de formación de espuma se expresó como el porcentaje de incremento del volumen, la estabilidad de la espuma se calcula como el porcentaje del volumen remanente después de 60 minutos de reposo a temperatura ambiente.

5.7.3 Evaluación de la capacidad de formar geles.

Se utilizó una fracción neutralizada de los concentrados de proteína obtenidos del proceso ácido y alcalino. La humedad se ajustó al 80%. Se preparó un “sol” de concentrado de proteína mezclada con 2.5% (w/w) de NaCl; para tener en promedio una concentración final de 0.43M NaCl y 80% de humedad. Se tomaron alícuotas de 20 g del “sol” las cuales fueron empacadas en vasos de precipitado de 30 ml, estos vasos conteniendo el sol se colocaron en bolsas de polietileno, fueron sellados al vacío y colocados en baño de hielo hasta su uso. Los “soles” empacados fueron sometidos a un tratamiento térmico en un baño María, a 90°C durante 30 min. Posteriormente, se colocaron en un baño de agua-hielo (0-2°C) y se mantuvieron ahí durante 24 horas. A los geles así obtenidos se les realizó la prueba de capacidad de retención de agua, prueba de doblado y el análisis de perfil de textura (APT).

Para la prueba de doblado, los geles se sacaron del vaso y con una navaja se cortaron secciones circulares (o rebanadas) de 3 mm de espesor. Estas rebanadas se doblaron a la mitad y se doblan otra vez para formar cuadrantes. La evaluación de doblado se basó en una escala de cinco puntos (Suzuki, 1981 en: Ayensa *et al.*, 2002), con la cual se

designó 5) si la rebanada de gel no se quebraba al doblarlo en cuadrantes, 4) si no presentaba quiebre al ser doblado por la mitad; 3) si presentaba desarrollo gradual de quiebre al doblarlo por la mitad; 2) si ocurría un quiebre inmediato al doblarse por la mitad; y 1) si se desmoronaba al ser presionado con los dedos.

El APT corresponde a una doble compresión que equivale a la simulación de una doble mordida, este análisis se realizó a geles cilíndricos de calamar de 1 cm de altura y 1 cm de diámetro, para lo cual se utilizó un texturómetro universal (Instron modelo 1132, serie 125) siguiendo la metodología de Bourne (1978) con algunas modificaciones: se utilizó una celda consistente en un cilindro de cara plana de 78 mm de diámetro para comprimir geles cilíndricos de calamar (24.52 N, carga de 50 kg, y a 0.10 m min⁻¹ de velocidad de cabezal), a una compresión de 75%, esta compresión se realizó dos veces en un movimiento recíprocante que imitó la acción de la mandíbula al masticar. Se generó una curva fuerza-desplazamiento para los geles de calamar. Se evaluaron los atributos de textura: dureza de gel (altura del primer pico en la gráfica resultante) que es la fuerza necesaria para comprimir el gel al 75% y representa la fuerza de la primera mordida y cohesión (relación de áreas de ambos picos) que es la integridad del gel después de la primera y segunda compresión.

La determinación del contenido de proteína total en las muestras de los concentrados de proteína de músculo de calamar y los geles fue realizada por el método de combustión Dumas, (AOAC 990.03, 1984) utilizando un equipo de determinación de nitrógeno/proteína modelo LECO FP-528 (LECO Corporation, USA) y un factor de conversión de 6.25.

5.8 Análisis Estadístico

En el caso de este trabajo se utilizó un modelo fijo. Se evaluó una variable respuesta (variable dependiente) modificando solo una variable en cada experimento. Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Kruskal-Walis para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) en los experimentos a un 95% de confiabilidad.

Todos los análisis fueron evaluados por triplicado. Dos relaciones fueron analizadas: 1) La influencia del tratamiento de la materia prima sobre el proceso ácido o proceso alcalino, o bien, 2) Si ambos procesos ácido y alcalino respondían significativamente de igual manera ante un mismo tratamiento.

Se corroboró la homogeneidad de varianzas de los datos por la prueba de Barlet, con el fin de identificar tanto las poblaciones de datos con comportamiento normal, así como las que no lo presentaban. Para los análisis paramétricos se empleó la Prueba de Multirango para determinar cual de las medias fue significativamente diferente de las demás (95% de confiabilidad). Los análisis no paramétricos se utilizaron comparaciones de gráficas de caja y bigote para determinar cual de las poblaciones fue significativamente (95% de confiabilidad) diferente de las demás. El programa utilizado fue Statgraphics^R Plus V. 5.0.

VI. RESULTADOS

6.1 Solubilidad de las Proteínas Respecto al pH

Se evaluó la solubilidad de las proteínas musculares de calamar con respecto al pH. Al mismo tiempo, fueron evaluadas tres muestras con diferentes tratamientos de preparación. Fue importante identificar los valores de pH de más alta y baja solubilidad, ya

que estos son necesarios para llevar a cabo los procesos de solubilización ácida y alcalina de la manera más óptima. Se construyeron 3 graficas de solubilidad dentro del rango de pH 2.0 a 12 (figura 5). Las 3 graficas evidenciaron un patrón similar de solubilidad, la cual presenta una típica forma de “U” reportada para otras especies (Choi y Park, 2002; Yongsawatdigul y Park, 2004; Kristinsson *et al.*, 2005). La concentración de proteína soluble se incrementó conforme se van alcanzando los valores de pH extremos ácido y alcalino, y a la vez, alejándose de los pH's 5.0-6.0. Se alcanzaron las mayores concentraciones de proteínas solubles en los valores de pH 2.0 a 3.0 para el extremo ácido y pH 11.0 a 12.0 para el extremo alcalino. Por otro lado, no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en proteína soluble cuantificada entre los valores de pH 2.0, 2.5, 3.0 en ninguna de las muestras, por lo que se eligió a pH 3.0 para el proceso de solubilización ácida. De la misma manera, no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) en proteína soluble cuantificada entre los valores de pH 11.0, 11.5 y 12.0 en ninguna de las muestras, por lo que se eligió a pH 11.0 para el proceso de solubilización alcalina. El criterio para seleccionar a pH 3.0 y 11.0 como los valores idóneos para los procesos, es que estos son los primeros en ofrecer el valor de máxima solubilidad, por lo que no tendría sentido elegir cualquiera de los otros valores (pH 2.0, 2.5 y 11.5, 12.0), ya que eso implicaría seguir adicionando HCl o NaOH.

También se identificó el rango de pH donde se encuentran los puntos iso-eléctricos (pI) de la mayoría de las proteínas de músculo de calamar, ya que a los valores de pH de 5.0, 5.5 y 6.0 se encontraron los valores más bajos de proteína soluble. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellos en ninguna de las muestras, por lo que se eligió el pH 5.5 como valor intermedio adecuado para la etapa de precipitación en los procesos de pH *Shift*.

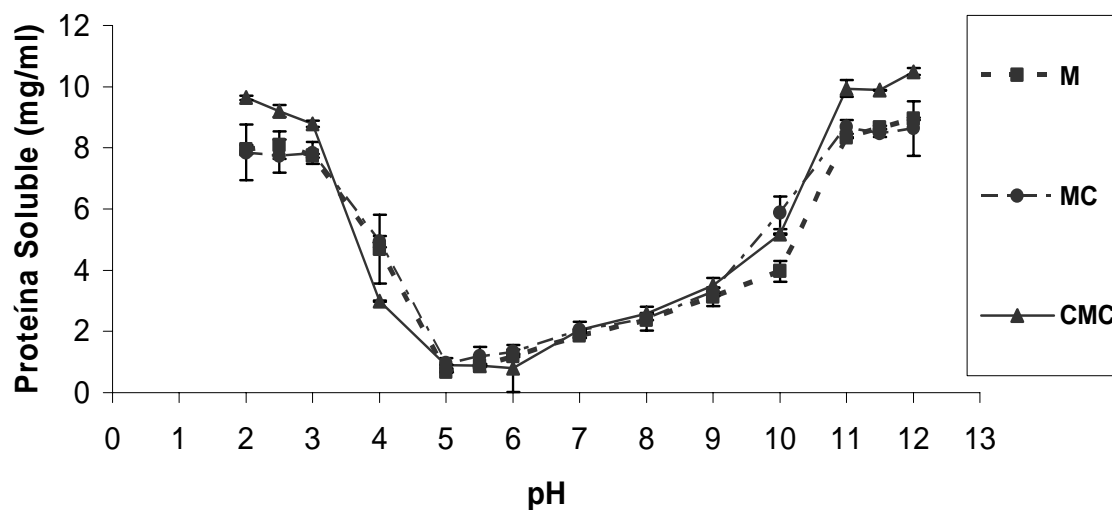


Figura 5- Efecto del pH en la solubilidad de las proteínas de calamar de pH 2.0-12.0. El músculo de calamar con diferentes tratamientos de preparación fue homogenizado en 9 volúmenes de agua destilada. El pH se ajustó adicionando HCl 2N ó NaOH 2N. Los tratamientos fueron *M*: Calamar molido, *MC*: Calamar molido y congelado, *CMC*: Calamar congelado, molido y congelado.

6.2 Solubilidad, Precipitación y Recuperación de Proteína por los Procesos Ácido y Alcalino (pH Shift)

A partir de los valores de pH elegidos para la etapa de solubilización (pH 3.0 y pH 11.0) y la etapa de precipitación (pH 5.5), se evaluó la eficiencia de solubilización, precipitación y recuperación de proteína en cada etapa en ambos procesos. Se obtuvo una tabla de rendimientos utilizando las muestras de músculo calamar con tres diferentes tratamientos (Tabla 2).

En la etapa de solubilización, el proceso ácido no presentó diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tres tratamientos (M, MC, CMC); del mismo modo para el proceso alcalino. Entre ambos procesos ácido y alcalino no se obtuvieron diferencias significativas ($P>0.05$), ya que en ambos valores de pH tanto ácido (pH 3.0) como alcalino (pH 11.0) se solubilizaron alrededor del 80% de las proteínas presentes en el homogenizado inicial (Tabla 2, columna 2).



Imagen 1- Material no soluble y sedimentado después de la 1^{ra} centrifugación.

Por su parte, la etapa de precipitación presenta el mismo fenómeno entre ambos procesos al no presentar diferencias significativas ante los tres tratamientos, logrando precipitar alrededor del 90% de la proteína solubilizada en la etapa de solubilización (Tabla 2, columna 3). Finalmente, ambos procesos no presentan diferencias significativas ($P>0.05$) en la recuperación total de proteína de músculo de calamar con diferentes tratamientos, recuperando alrededor del 77.8% de la proteína presente en el homogenizado inicial (Tabla 2, columna 4).

Cabe mencionar, que en el tratamiento del músculo CMC (congelado-molido-congelado), se recupera más proteína con ambos procesos y el proceso alcalino mostró

mayor recuperación de proteína en todos los casos, lo cual también se aprecia en la curva de solubilidad de la Figura 1.

Tabla 2- Rendimientos de recuperación de proteína utilizando los procesos ácido y alcalino. Los resultados no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$).

Proceso	Proteína Solubilizada	Proteína Precipitada	Proteína Recuperada	Total
<i>M</i>				
Ácido	85% ± 2.8%	91% ± 5.8%	77.3% ± 6.2%	
Alcalino	90% ± 3.0%	90% ± 1%	85.6% ± 5.1%	
<i>MC</i>				
Ácido	78% ± 2.6%	91% ± 1.7%	71.6% ± 5.0%	
Alcalino	79% ± 2.1%	90% ± 1%	72% ± 1.7%	
<i>CMC</i>				
Ácido	89% ± 2.1%	90% ± 4.7%	80% ± 5.2%	
Alcalino	87% ± 3.8%	93% ± 1.3%	81.3% ± 5.0%	

^M Calamar molido

^{MC} Calamar molido y congelado

^{CMC} Calamar congelado, molido y congelado

6.3 Obtención de Concentrados de Proteína

En este trabajo se le considera concentrado de proteína a aquel producto obtenido en la segunda centrifugación, colectado y nuevamente centrifugado para retirar el exceso de agua y que resulta finalmente en una pasta con una humedad del 85%. Dicho valor de humedad es recomendado por varios autores (Gómez *et al.*, 1997; Hultin y Kelleher, 1999; Hultin *et al.*, 2000), para realizar las pruebas de funcionalidad. Se generó una tabla de

rendimiento respecto a la materia prima utilizada al inicio del proceso y a la cantidad de concentrado de proteína obtenido al final del mismo (Tabla 3), es decir, una relación entre el peso (g) de la materia prima que es introducida al proceso y el monto (g) de concentrado de proteína que se produce u obtiene al final.

El rendimiento promedio de recuperación de concentrado de proteína en laboratorio para los procesos ácido y alcalino fue del 58.1%. No hubo diferencia significativa entre ambos procesos ($P>0.05$). El tratamiento previo a la solubilización no afectó el rendimiento. Sin embargo, se puede apreciar nuevamente que el proceso alcalino mostró mayor recuperación de proteína en todos los casos (Tabla 3), lo cual también se observa en la Tabla 2.



Imagen 2- Concentrado de proteína obtenido por los procesos de ácido y alcalino.

Tabla 3- Rendimientos totales en la obtención de concentrados de proteínas de músculo de calamar con diferentes tratamientos empleando los procesos ácido y alcalino. Los cálculos están basados en los gramos de materia prima utilizada. Los resultados no presentaron diferencias significativas ($P>0.05$).

Proceso	Concentrado de Proteína de Calamar (85% Humedad)
<i>M</i>	
Ácido	54.4%± 0.15
Alcalino	56.2%± 0.13
<i>MC</i>	
Ácido	56.6%±1.1
Alcalino	60.2%± 1.2
<i>CMC</i>	
Ácido	58.7%± 2.3
Alcalino	62.6% ± 3.8
<i>M</i> Calamar molido	
<i>MC</i> Calamar molido y congelado	
<i>CMC</i> Calamar congelado, molido y congelado	

6.4 Agua Recuperada al Final de los Procesos Ácido y Alcalino

En base a observaciones preliminares se consideró importante medir el volumen de agua al final del proceso (Tabla 4), para evaluar el consumo y posible reuso. El agua al final del proceso contiene, en promedio, 0.80 ± 0.15 mg/ml de proteína.

Tabla 4- Volumen total de agua recuperada al final del proceso ácido y alcalino.

Proceso	Agua Recuperada al final del Proceso (0.8 ± 0.15 mg/ml de proteína soluble)
Ácido	$92.7\% \pm 1.3\%$
Alcalino	$94.6\% \pm 2.2\%$

Los rendimientos están calculados con base a la cantidad de agua utilizada al inicio. Los resultados no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Para ambos procesos e incluso entre tratamientos no se presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los volúmenes de agua recuperada al final de los procesos. En todas las replicas realizadas se recuperó un poco más del 90% del agua utilizada. En algunas excepciones se logró recuperar solo el 85% del agua utilizada.



Imagen 3- Agua al final del los procesos ácido o alcalino.

6.5 Composición de Proteína por SDS-PAGE

6.5.1 Solubilidad de las Proteínas de calamar Respecto al pH

En la Figura 6 se muestran en SDS-PAGE las fracciones de proteína soluble correspondiente a cada punto pH según los datos presentados en la gráfica de la Figura 5. En el gel de electroforesis se distinguen tres bandas de proteínas, las cuales fueron las de mayor interés durante este trabajo: cadena pesada de la miosina o MHC (~205 kD), paramiosina (~108kD) y actina (~45 kD). También se distingue una banda con un peso molecular de ~150kD, la cual podría corresponder a la meromiosina pesada según lo reportando por Sánchez *et al.* (2007). La intensidad de las bandas de MHC, paramiosina y actina es mayor a los pH 2, 3 y 4, y a pH 10, 11 y 12. Por el lado contrario, las intensidades de estas bandas van disminuyendo drásticamente conforme se acercan los valores de pH 5, 5.5 y 6, y prácticamente desaparecen a pH 5. Lo anterior ciertamente tiene relación y coherencia con lo observado en la Figura 5, lo cual se discutirá más adelante.

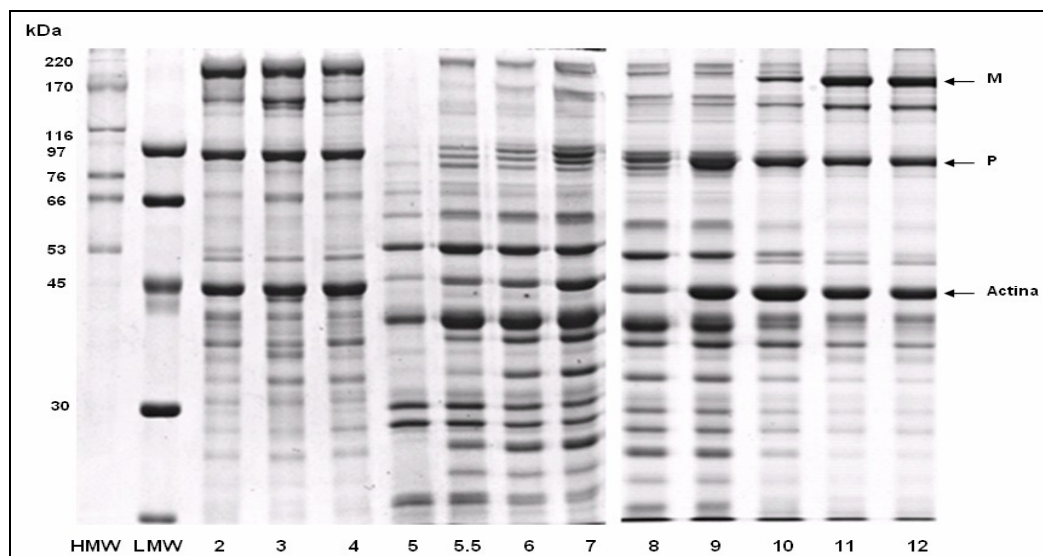


Figura 6- Electroforesis de las proteínas solubles a diferentes valores de pH (2.0-12.0). Fueron usados 20 μg de proteína en cada carril. La electroforesis se llevó a cabo en condiciones reductoras. Los números en la base de cada carril corresponde al valor de pH evaluado (2.0-12.0) M, cadena pesada de la miosina; P, paramiosina. HMW, marcador de alto peso molecular; LMW, marcador de bajo peso molecular.

6.5.2 Solubilidad y recuperación de proteínas en los procesos ácido y alcalino

Se analizaron muestras correspondientes a cada etapa del proceso ácido (A) y alcalino (B), con el fin de observar algún cambio en el patrón de proteínas durante todo el proceso, sobre todo enfocándose nuestro interés en miosina, actina y paramiosina.

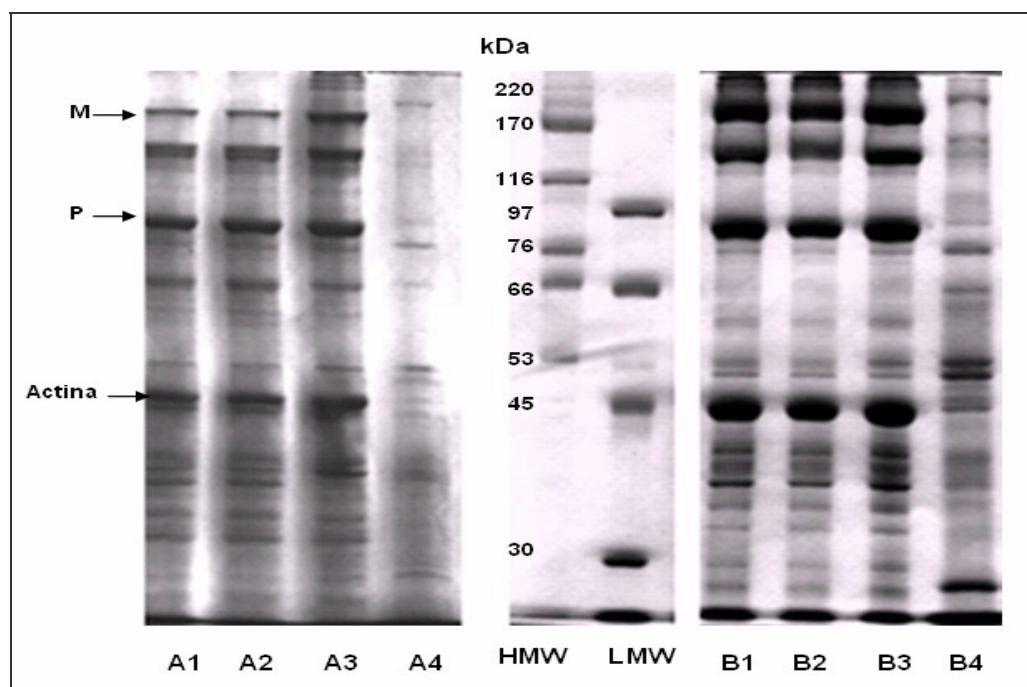


Figura 7- SDS-PAGE de proteína de las diferentes etapas del proceso ácido y alcalino. Se colocaron 20 μg de proteína en cada carril en condiciones reductoras. A, proceso ácido; B, proceso alcalino. 1, homogenizado inicial (pH 3 ò pH 11); 2, fracción soluble después de la 1^{ra} centrifugación; 3, concentrado de proteína; 4, agua al final del proceso. M, cadena pesada de la miosina; P, paramiosina. HMW, marcador de alto peso molecular; LMW, marcador de bajo peso molecular.

En la Figura 7, se aprecia que las bandas correspondientes a la cabeza pesada de la miosina (~205 kD), paramiosina (~108kD) y actina (~45 kD) están presentes en la solubilización a pH ácido y alcalino (A1 y B1) y van siendo recuperadas durante todo el proceso hasta estar presentes finalmente en el concentrado de proteína (A3 y B3). Incluso, estas mismas proteínas prácticamente no se aprecian en el agua al final del proceso (A4 y B4) después de la precipitación iso-eléctrica.

De acuerdo a estas 3 proteínas, el patrón electrofóretico es similar en ambos procesos. La intensidad de estas bandas de proteína es más evidente en el proceso alcalino. Las proteínas restantes presentes en el agua, se asume que son proteínas relacionadas a la fracción sarcoplásmica según Hultin *et al.* (2005). El agua al final de proceso alcalino presenta mayor presencia de proteínas, incluyendo remanentes de actina (~45 kD).

6.5.3 Formación de agregaciones vía enlaces disulfuro

Por otro parte, de acuerdo a la literatura, se sabe que es posible la formación de agregados de las cadenas pesadas de la miosina vía enlaces disulfuro. En la Figura 8 se muestra otro gel de electroforesis en el que se utilizaron las mismas muestras presentadas en la Figura 7, pero en este caso, se hizo una comparación en condiciones reductoras (con DTT) y en condiciones no reductoras (sin DTT), con el objetivo de observar agregados con pesos mayores a los 200 kDa. Se observó el mismo patrón de bandas mostrado en la Figura 7 para las muestras del proceso ácido y alcalino en condiciones reductoras. La diferencia observada es que en las muestras en condiciones no reductoras, la banda de la cadena pesada de miosina no se encuentra bien definida y a su vez, se observan agregados de diferentes pesos por arriba de las 200 kDa.

Lo anterior hace concluir de la posible polimerización entre cadenas pesadas posiblemente debido a la formación de enlaces disulfuro desde la etapa de solubilización (A1 y B1, No Reductoras). Dichas polimerizaciones se observan aún más intensas en las muestras del proceso alcalino.

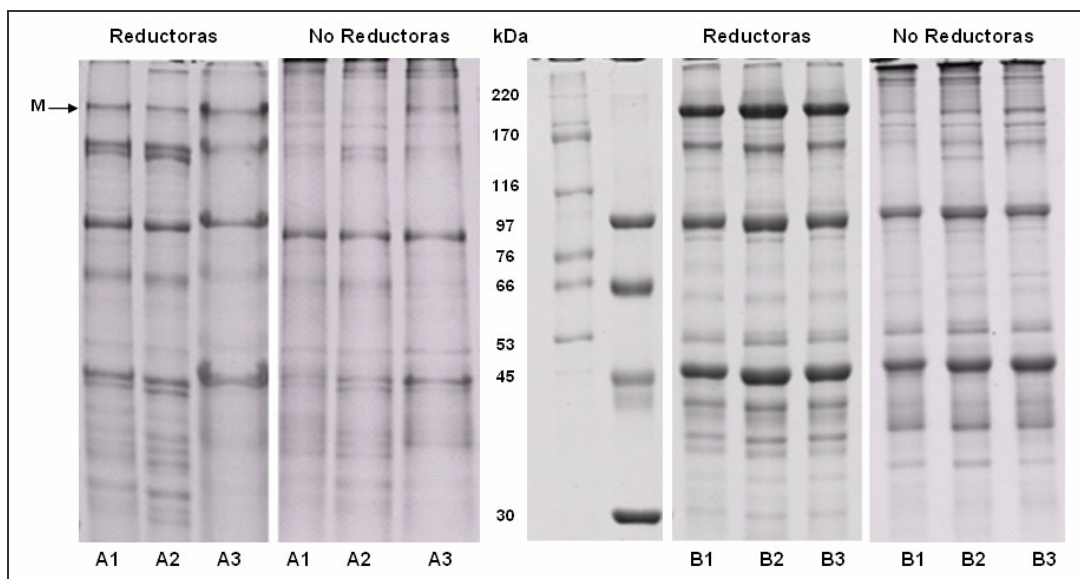


Figura 8- SDS-PAGE de muestras de proteína en condiciones reductoras y no reductoras de las diferentes etapas del proceso ácido y alcalino. Se colocaron 20 μg de proteína en cada carril en condiciones reductoras y no reductoras. A, proceso ácido, B, proceso alcalino. 1, homogenizado inicial (pH 3 ò pH 11); 2, fracción soluble después de la 1^{ra} centrifugación; 3, concentrado de proteína; 4, agua al final del proceso. M, cadena pesada de la miosina; P, paramiosina. HMW, marcador de alto peso molecular; LMW, marcador de bajo peso molecular.

6.6 Capacidad y Estabilidad de Emulsión de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino

Tanto la capacidad de formar emulsión como la estabilidad de la misma fueron evaluadas para cada concentrado de proteína (CP) obtenido al final de los procesos ácido y alcalino utilizando el músculo de calamar con los diferentes tratamientos. De la misma manera, el músculo de calamar CMC y albúmina de huevo fueron evaluadas a modo de comparación.

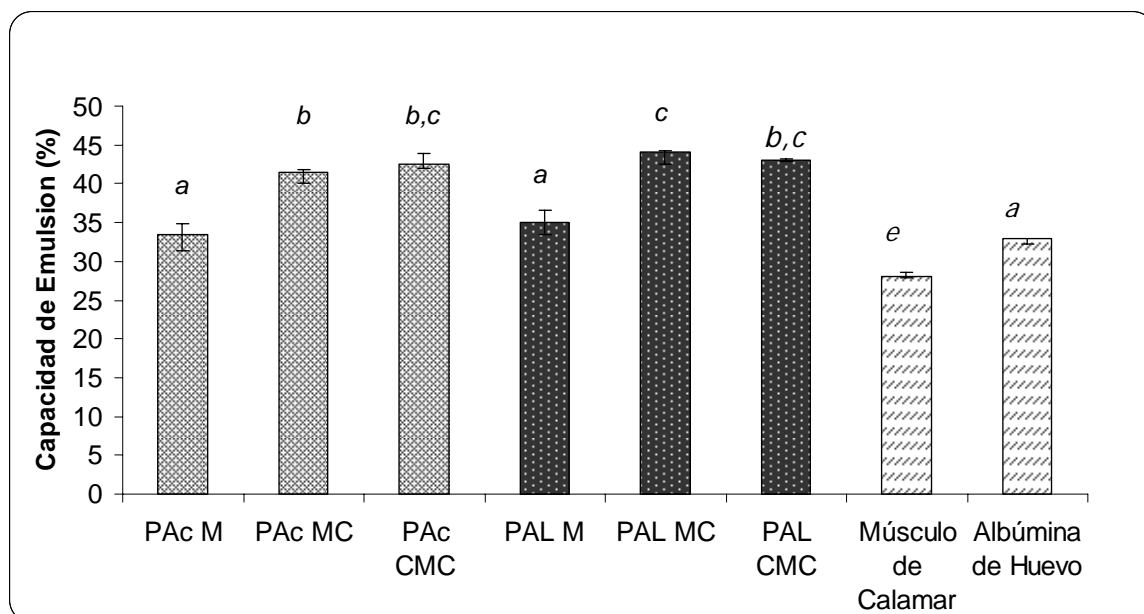


Figura 9- Capacidad de formación de emulsión de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos ácido (PAc) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos. (M) molido; (MC) Calamar molido y congelado; (CMC) Calamar congelado, molido y congelado. Albúmina de huevo y músculo de calamar CMC a modo de comparación. Barras mostrando diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

De acuerdo a la Figura 9, se observa que la capacidad de formar emulsión de los concentrados de proteína a partir de músculo MC y CMC en ambos procesos no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$), y estos además presentan mayor ($P < 0.05$) capacidad de emulsión que el concentrado de músculo M en ambos procesos. Por su parte, el concentrado de proteína de calamar M no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los procesos ácido y alcalino.

Los tratamientos de solubilización a pH ácido y alcalino mejoraron la capacidad de emulsión del grupo control (músculo molido), ($P < 0.05$). La capacidad de emulsión de la albúmina de huevo no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto a los CP de PAC M y PAL M, pero si mostró menor capacidad de emulsión respecto a los concentrados de músculo MC y CMC con ambos procesos.

En cuanto a la estabilidad en la emulsión generada (Figura 10), se encontró que todos los concentrados de proteína y el grupo control presentan alta estabilidad con valores alrededor del 98%. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre procesos, ni entre tratamientos y/o controles.

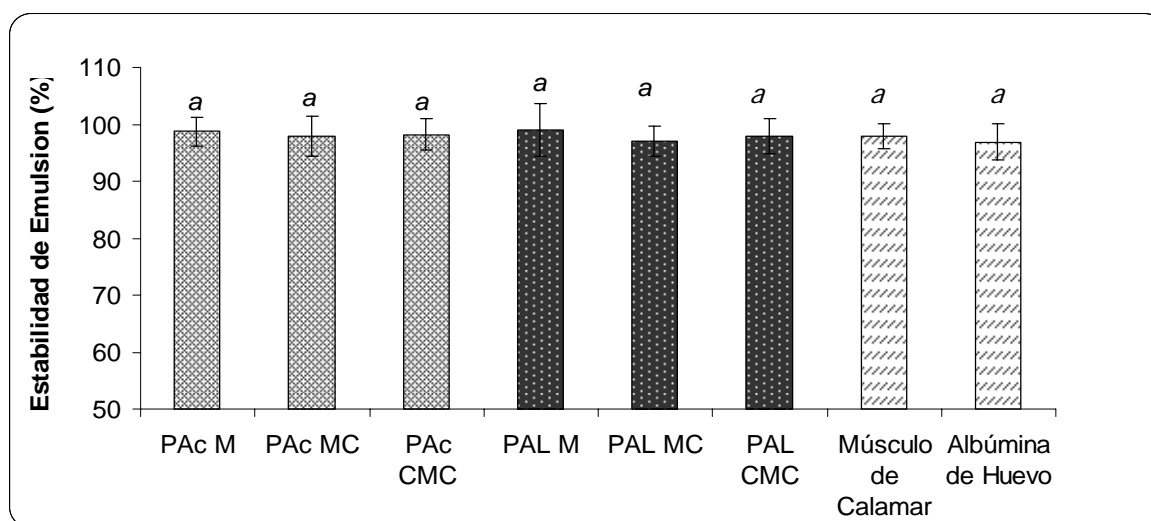


Figura 10- Estabilidad de la emulsión generada por los concentrados de proteína obtenidos de los procesos de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos: (M) molido; (MC) Calamar molido y congelado; (CMC) Calamar congelado, molido y congelado. Albúmina de huevo y músculo de calamar CMC como control. Barras mostrando diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

6.7 Capacidad y Estabilidad de Formación de Espuma de los Concentrados de Proteína del Proceso Acido y Alcalino

Tanto la capacidad de formar espuma como la estabilidad de la misma fueron evaluadas para cada concentrado de proteína (CP) obtenido al final de los procesos ácido y alcalino utilizando el músculo de calamar con los diferentes tratamientos. Por otro lado, el músculo de calamar CMC y albúmina de huevo fueron evaluadas de la misma manera a modo de comparación.

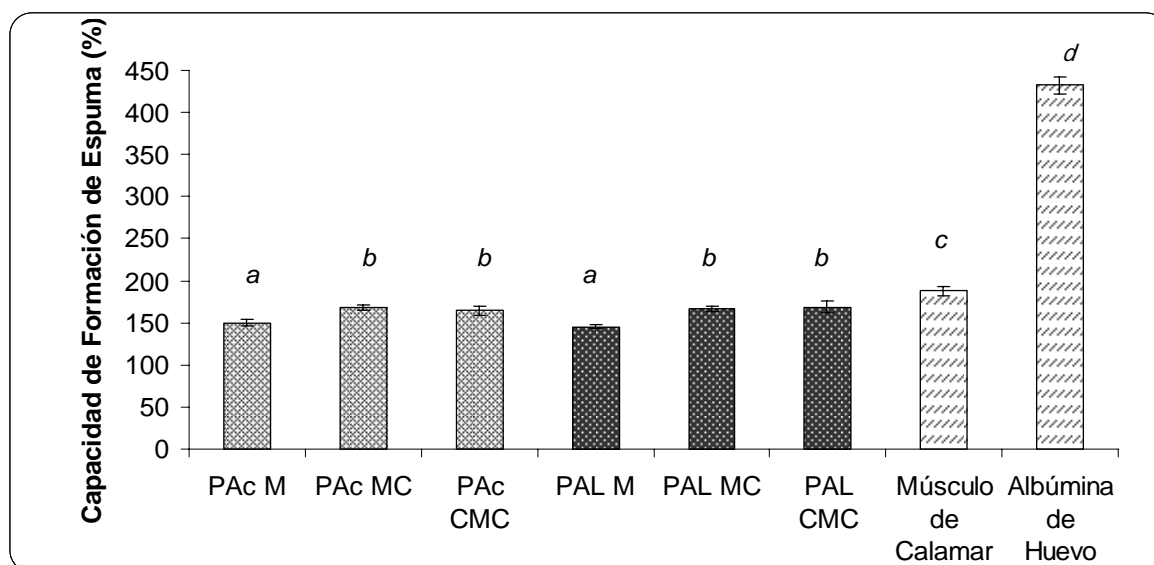


Figura 11- Capacidad de formación de espuma de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos ácido (PAc) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos: (*M*) molido; (*MC*) Calamar molido y congelado; (*CMC*) Calamar congelado, molido y congelado. Albúmina de huevo y músculo de calamar CMC como control. Barras mostrando diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

De acuerdo a los resultados que se muestran en la Figura 11, se observa que la capacidad de formar espuma de los concentrados de proteína a partir de músculo MC y CMC en ambos procesos no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$), además presentaron mayor ($P < 0.05$) capacidad de formación de espuma que el concentrado de músculo M en ambos procesos. Por su parte, el concentrado de proteína de calamar M no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$) entre ambos procesos.

El músculo de calamar sin procesar, presentó mayor ($P < 0.05$) capacidad de formación de espuma que los concentrados de proteína de ambos procesos, es decir, dichas proteínas del músculo sin procesar, son capaces de generar filmes en la interfase entre agua y aire en mayor grado que los concentrados obtenidos por *pH shift*. La albúmina de huevo, siendo reconocida como excelente espumante (Matringe *et al.*, 1999), mostró evidentemente mayor ($P < 0.05$) capacidad de espumado que todas las muestras anteriores con un 437% de espumado.

Complementariamente, se evaluó la estabilidad de la espuma (Figura 12) formada usando los CP de las diferentes muestras. Se puede observar que los concentrados a partir de músculo M presentaron mayor ($P < 0.05$) estabilidad de espumado que los CP de los tratamientos MC y CMC, esto, en ambos procesos. En el proceso ácido, los CP a partir de músculo con tratamientos MC y CMC no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en la estabilidad, pero para el caso del proceso alcalino, ocurre un fenómeno similar donde estos van disminuyendo su estabilidad en orden de tratamientos ($M > MC > CMC$)

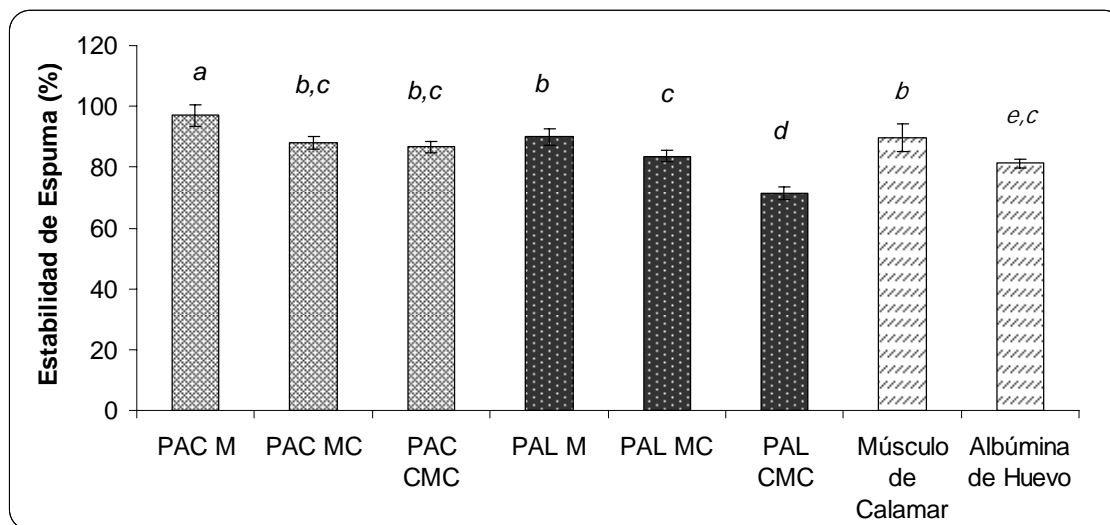


Figura 12- Estabilidad de la espuma generada a partir de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos de los procesos ácido (PAC) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos: (M) molido; (MC) Calamar molido y congelado; (CMC) Calamar congelado, molido y congelado. Albúmina de huevo y músculo de calamar CMC como control. Barras mostrando diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuanto al músculo de calamar del grupo control, presentó similar ($P > 0.05$) estabilidad que los tratamientos MC y CMC del proceso ácido y similar al tratamiento M del proceso alcalino. Respecto a la albúmina de huevo, esta generó excelente formación de espuma, pero no presentó tan buena estabilidad de la misma comparada con la mayoría de los concentrados de proteína de calamar.

6.8 Capacidad de Gelificación de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino

Fueron realizados los análisis de perfil de textura y capacidad de retención de agua (CRA) para los geles obtenidos de los concentrados de proteína (CP) a partir de músculo MC y CM de ambos procesos ácido y alcalino, así como también a los geles obtenidos de músculo de calamar CMC a modo de comparación.

Se observó (Figura 13) que los geles de CP del proceso alcalino mostraron mayor ($P<0.05$) dureza de gel que los CP del proceso ácido, usando músculo con los dos tratamientos congelado-molido (CM) y molido-congelado (MC).

Los geles elaborados a partir de músculo de calamar presentaron la menor ($P<0.05$) dureza de gel en comparación con los CP de los procesos ácido y alcalino.

También, se pudo observar (Figura 13) que los geles de los CP del proceso ácido respondieron de similar manera al no presentar diferencias significativas ($P>0.05$) en la dureza de gel. Por su parte, los geles de los CP del proceso alcalino mostraron una dureza de gel significativamente diferentes ($P<0.05$), siendo el tratamiento CM el que presentó mayor dureza de gel.

Los parámetros de fuerza de gel y cohesividad (Tabla 5) coinciden perfectamente con el patrón relacionado al de dureza de gel, donde los geles de los CP del proceso alcalino mostraron significativamente mayor ($P<0.05$) fuerza y cohesividad que los geles de CP del proceso ácido. El gel de músculo de calamar mostró menor ($P<0.05$) fuerza y cohesividad que los geles de CP de ambos procesos.

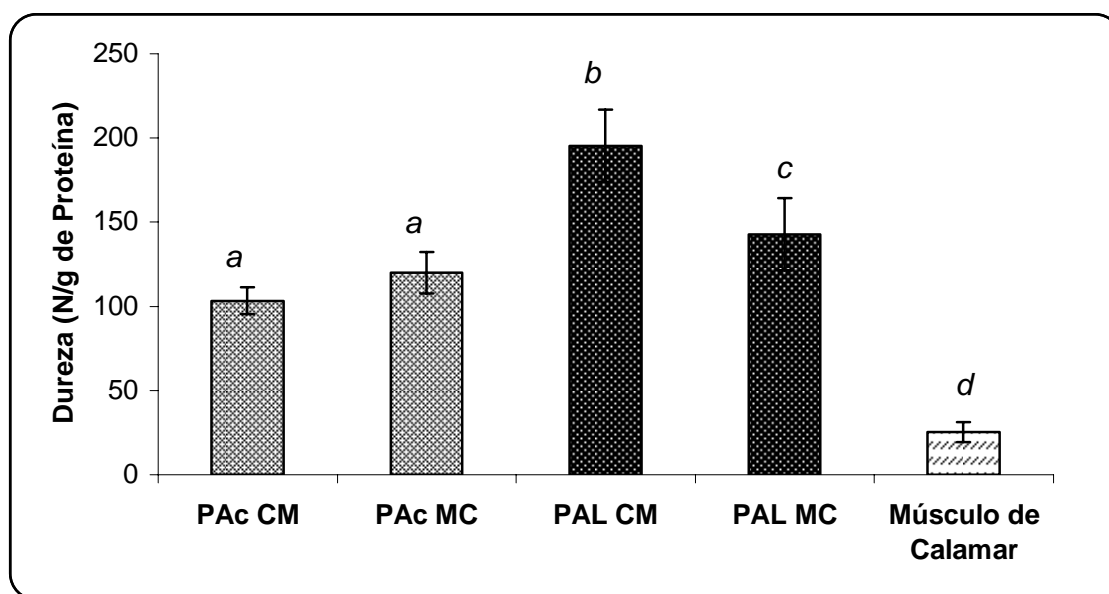


Figura 13- Dureza de los geles elaborados a partir de los concentrados de proteína obtenidos de los procesos ácido (PAc) y alcalino (PAL) utilizando músculo de calamar con diferentes tratamientos: (MC) Calamar molido y congelado; (CM) Calamar congelado y molido. Músculo de calamar CMC como control. Barras mostrando diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

En cuanto a la CRA, estos también muestran el patrón similar ya mencionado, sin embargo, todas las muestras tanto de los CP como del músculo de calamar, no presentaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) al lograr retener casi el 100% del agua contenido en los geles.

En la prueba de doblado todas las muestras de CP no presentaron rupturas, obteniendo el valor más alto, 5. En cambio, geles de músculo de calamar lograron un valor intermedio entre 4 y 5, ya que algunas de las replicas sufrieron rupturas en el segundo doblado.

Tabla 5- Análisis de perfil de textura y CRA de los geles a partir de los CP de los procesos ácido (PAc) y alcalino (PAI) con diferentes tratamientos. Geles de músculo de calamar sin procesamiento fueron evaluados como control.

Parámetro	Gel de PAc CM	Gel de PAc MC	Gel de PAI CM	Gel de PAL MC	Gel de músculo de calamar
Fuerza de gel (N.mm/g)	330.4 ±3.24 a	385.6 ±3.7 a	562.07±5.5 b	445.2 ±4.3 c	59.6±0.58 d
Cohesividad	0.039 ±0.003 a	0.042 ±0.009 a	0.053 ±0.008 b	0.051 ±0.009 b	0.030 ±0.006 c
*CRA (%)	99.2±0.2 a	99.5±0.1 a	99.8±0.2 a	99.6±0.5 a	97.3±0.8 a
Prueba de Doblado	5 a	5 a	5 a	5 a	4.5 b

* CRA (capacidad de retención de agua)

Parámetros de fuerza de gel y cohesividad fueron calculados por gramo de proteína.

Columnas con diferentes letras indican diferencias significativas ($P<0.05$).

VII. DISCUSIÓN

7.1 Solubilidad de las Proteínas de Calamar Respecto al pH

El conocimiento de la solubilidad de las proteínas musculares a diferentes valores de pH es importante para optimizar los parámetros del proceso de recuperación usando los procesos de solubilización ácida y alcalina. Durante la operación unitaria de solubilización por pH, la mayor solubilidad de las proteínas musculares posible es necesaria para separarlas eficientemente de impurezas; mientras que durante la operación de precipitación

de la proteína previamente solubilizada, la menor solubilidad posible es buscada para lograr una eficiente recuperación de proteína por precipitación iso-eléctrica. La solubilidad observada de las proteínas musculares de calamar con diferentes tratamientos se muestra en la Figura 5.

A pesar de que las proteínas musculares de calamar de los diferentes tratamientos (M, MC y CMC) experimentaron condiciones severas de desnaturalización debido a los procesos de molienda, congelación y almacenamiento a -30°C , estas presentan, en los tres casos, un patrón similar de solubilización reportado para varias especies de pescado (Choi y Park, 2002; Yongsawatdigul y Park, 2004; Kristinsson *et al.*, 2005; Kristinsson y Liang, 2006) y para calamar *Dosidicus gigas* (Rocha, 2006; de la Fuente, 2006). La menor solubilidad se presentó a los valores entre pH 5.0-6.0, alcanzando a su vez los valores máximos de solubilidad a pH 3.0 y pH 11.0, es decir, conforme las proteínas son alejadas de sus puntos iso-eléctricos (pI) la solubilidad de las mismas se incrementa. Este comportamiento de solubilidad se debe a que las proteínas adquieren una carga neta positiva por debajo de su pI, o bien, adquieren una carga neta negativa por arriba de su pI, favoreciendo su solubilización (Stefansson y Hultin, 1994; Choi y Park, 2002; Kristinsson y Liang, 2006), lo cual será discutido más adelante. El hecho de que a los valores extremos de pH ácido (2.0, 2.5 y 3.0) y pH alcalino (11.0, 11.5 y 12.0) no existan diferencias significativas ($P > 0.05$), está relacionado a que a pH 3.0 ó pH 11.0 la mayoría de las proteínas ya se encuentran solubles (Figura 6) y solo una cantidad menor será solubilizada a pesar de seguir reduciendo o aumentando el pH, de tal manera que los incrementos en concentración de proteína soluble a tales valores de pH extremos serán mínimos.

Los valores de pH de baja solubilidad (pH 5.0-6.0) están relacionados con los puntos iso-eléctricos promedio de la mayoría de las proteínas musculares. Yongsawatdigul y Park (2004) reportaron que el complejo actomiosina era insoluble a pH 5.0-6.0, y ligeramente soluble a pH 7.0-9.0. Lin y Park (1998) reportaron que la miosina de salmón mostró mínima solubilidad a pH 4.0-5.0.

Con base a la Figura 5, se puede concluir que las proteínas musculares de calamar presentan un patrón similar de solubilidad independientemente si estas fueron sometidas a condiciones desnaturalizantes por congelación y molienda. Cabe mencionar, que al igual que Rocha (2006) y de la Fuente (2006), en este trabajo se tuvo interés en llevar a cabo un adecuado manejo post-captura, manteniendo el músculo limpio, aislado en bolsas herméticas y a temperaturas inferiores a 1°C antes de ser preparado y/o procesado. Sin tales cuidados, otras variables (Ej.: actividad proteolítica endógena y exógena) hubieran interferido negativamente en nuestros experimentos. La mínima o poca influencia aparente de las condiciones de los tratamientos de las muestras sobre la solubilidad de las proteínas será discutido más adelante.

7.2 Solubilidad, Precipitación y Recuperación de Proteína por los Procesos Ácido y Alcalino (pH *Shift*)

La etapa inicial de solubilización a pH ácido o alcalino se puede llevar a cabo en las proteínas musculares de calamar (Tabla 2) debido a que estas adquieren una carga neta positiva o negativa, respectivamente (Hultin, 2002; Kristinsson y Liang, 2006). El incremento de las cargas neta positivas de las proteínas a bajos pH's proviene principalmente de la neutralización de las cargas negativas de las cadenas laterales con

grupos carboxilos del ácido aspártico y glutámico, los cuales presentan valores de pKa de 4.2 y 3.8 respectivamente. Por el otro lado, el incremento de las cargas netas negativas en las proteínas a pH's altos, se debe principalmente a la desprotonación de los grupos básicos como la cadena lateral de histidina (grupo imidazol), la arginina (guanidil) y lisina, y a la desprotonación de las cadenas laterales fenólicas (Undeland *et al.*, 2002; Hultin *et al.*, 2005).

Para este momento, las proteínas de calamar en la etapa de solubilización han experimentado desnaturalización y desplegamiento, e incluso disociaciones entre ellas, lo cual genera la exposición de gran la mayoría de los residuos hidrofílicos y gran número de residuos hidrofóbicos que posiblemente se encontraban orientados hacia el interior de la estructura en un inicio (Kristinsson y Hultin, 2003a,b; Yongsawatdigul y Park, 2004).

Se ha demostrado que los principales cambios estructurales e interacciones entre las proteínas musculares se llevan a cabo en la etapa de solubilización (Kristinsson *et al.*, 2005). En el caso de las proteínas musculares de calamar, además de los cambios ya mencionados, se presume de la posible formación de agregados vía puentes disulfuros, sobre todo en la solubilización a pH alcalina (Figura 8). Esto coincide con lo reportado por Yongsawatdigul y Park, (2004) en merluza (*Merluccius productus*) y por lo encontrado por Thawornchinsombut y Park (2004) en Rockfish (*Sebastes flavidus*).

El hecho de que no se hayan presentado diferencias significativas ($P > 0.05$) en la etapa entre la solubilización ácida y alcalina, indica que en ambos casos, se logró una desnaturalización o desplegamiento a tal grado que se expusieron gran parte de los residuos de los aminoácidos que las conformaban, lo cual favoreció la interacción con el medio y facilitando aún más que las proteínas adquirieran carga neta positiva o negativa.

En los procesos ácido y alcalino se alcanzó un rendimiento promedio de solubilización de las proteínas del homogenizado inicial del 84% y 85%, respectivamente. Dichos porcentajes de solubilización oscilan entre los reportados en pescado como Herring (*Clupea harengus*) con 92% y 89% (Undeland *et al.*, 2002), Rockfish con un 80% (Yongsawatdigul y Park, 2004) y Macarela con 80% de solubilización (Hultin *et al.*, 2005). de la Fuente (2006) y Rocha (2006) observaron un 85% de solubilización de las proteínas musculares de *Dosidicus gigas* a valores de pH por debajo de 3.0 y por arriba de 11.0. Cabe mencionar, que Sánchez Alonso *et al.* (2007) lograron solubilizar el 70% de las proteínas de manto de *Dosidicus gigas*, pero en este caso, empleando fuerza iónica (0.5 M NaCl).

Los resultados (Tabla 2, columna 2) indican que no existen diferencias significativas ($P>0.05$) de solubilidad entre los tratamientos de las muestras de proteína de calamar, es decir, los tratamientos relacionados con la congelación, molienda y/o almacenamiento de las muestras a -30°C (MC y CMC), presentaron porcentajes de solubilidad iguales a los presentados en las proteínas de calamar M.

Pareciera que lo anterior va en contra de las evidencias comunes, ya que se sabe que las combinaciones entre congelación, molienda, almacenamiento y descongelación, pueden repercutir seriamente en la disminución de solubilidad de las proteínas musculares, esto es debido a la agregación y desnaturalización que sufren las mismas (Sikorski, 1994). Sin embargo, dichas repercusiones en la disminución de la solubilidad pueden ser mitigadas empleando los procesos de solubilización acida y alcalina. En las patentes de Hultin *et al.*, (2000) y Hultin y Kelleher (2002) se menciona el éxito de los procesos de pH *shift* para solubilizar y recuperar eficientemente alrededor de 80% de las proteínas de músculo de pescado deteriorado por congelación. Una posible explicación a lo anterior es que las

agregaciones de proteínas son reducidas en la fase de homogenización gracias a la acción mecánica y la influencia del agua presente en el medio (Hultin y Kelleher, 1999). De tal manera, que en esta etapa se asume que la gran mayoría de las proteínas lograrían encontrarse en forma monomérica, lo cual permite que estas interactúen libremente con el medio que las rodea (pH 3.0 ò pH 11.0) generándose así el fenómeno de solubilización antes mencionado, al mismo tiempo favorecido por el tiempo retención en agitación en medio acuoso. De tal forma, que tanto las proteínas de las muestras M, MC y CMC se solubilizan en los mismos porcentajes. Además, es de gran importancia mencionar que las proteínas de cefalópodos han mostrado resistencia a la desnaturalización inducida por la congelación (Moral *et al.*, 1981; Moral *et. al*, 2002), lo cual también concuerda con los resultados arrojados por la tesis de de la Fuente (2006), donde las proteínas congeladas y almacenadas por largos periodos, aún presentaban alta solubilidad a fuerza iónica 0.5M similar al músculo no congelado.

En el trabajo de Hultin *et al*, (2000) y Hultin y Kelleher (2002) se reporta el uso de proteínas de músculo de pescado congelado con rendimientos de solubilización superiores al 85%. Según discuten Hultin *et al.* (2005) la solubilización de las proteínas musculares en el homogenizado en la etapa de solubilización a pH ácido o alcalino pareciera ocurrir instantáneamente. Similares observaciones se tuvieron en la solubilización de proteínas de calamar en nuestro trabajo, ya que fueron necesarios de 5 a 7 minutos para lograr una solubilización eficiente. Sánchez Alonso *et al.* (2007) al utilizar calamar congelado y molido, reportan que el tiempo de solubilización fue de solo 5 minutos.

Después de la etapa de solubilización, la fracción de proteína soluble libre de impurezas después de la 1^{ra} centrifugación, es sometida a un reajuste de pH para precipitarlas (etapa de precipitación), lo cual se logra cuando las proteínas musculares solubles son expuestas a un pH cercano a su punto iso-eléctrico colectivo (pH 5.5), esto resulta en una carga neta cero en las proteínas promoviendo su agregación y consecuente precipitación (Shawky *et al.* 2000). En este punto, las proteínas experimentan un plegamiento parcial debido al cambio de pH y cargas de los residuos que la conforman, donde estas ya no recuperan su arreglo inicial o bien su conformación nativa (Kristinsson y Hultin, 2003a,b). La eficiencia de precipitación fue expresada en porcentaje (Tabla 2, columna 3). Tanto entre procesos como entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) exhibiendo un rendimiento de precipitación alrededor del 90.8%. Estos resultados coinciden con los reportados por Hultin y Kelleher (1999 y 2002), donde lograron un 90% de precipitación de las proteínas solubles usando los métodos de pH *shift*. Posteriormente Sánchez *et al.* (2007) reportaron un menor rendimiento de precipitación en su proceso, el cual fue de 70% a pH 4.5.

En el presente trabajo es importante hacer notar que las impurezas, o bien, el material no soluble descartado después de la primera centrifugación (Imagen 1), principalmente conformado por membranas celulares y tejido conectivo, presentó un evidente olor a amonio y una textura gelatinosa y fibrosa. Finalmente, las proteínas agregadas en la etapa de precipitación se recuperaron en la segunda centrifugación. El rendimiento promedio de recuperación de proteína total de los procesos ácido y alcalino fue de 76.3% y 79.6%, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los tres tratamientos (M, MC y CMC). Resultados similares fueron

obtenidos al utilizar Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*) con rendimientos de 78.7% y 65% (Kristinsson y Liang, 2006), y en bagre con 71.5% y 70.3% (Kristinsson *et al.*, 2005). En general para los procesos de pH *shift*, Hultin *et al.* (2005) establecen un rendimiento general del 85% usando músculo de pescado.

Como se puede apreciar, la etapa de solubilización es la más importante en los procesos de pH *shift*, ya que es aquí, cuando ocurren los fenómenos que repercutirán tanto en los rendimientos del proceso como posiblemente en la funcionalidad de los concentrados de proteína.

7.3 Obtención de Concentrados de Proteína y Recuperación de Agua de los Procesos Ácido y Alcalino.

Como ya se indicó en la Tabla 3, los rendimientos en la obtención de concentrados de proteína por los procesos ácido y alcalino no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre ellos ni entre los tratamientos. Dichos resultados coinciden con los presentados en la Tabla 2, los cuales ya fueron discutidos en el apartado anterior. Si bien, la eficiencia de los procesos ácido y alcalino repercuten en la producción de los concentrados obtenidos al final, los resultados de la Tabla 3 reflejan más la eficiencia operacional con la que se lleva a cabo el proceso, es decir, estos rendimientos y cálculos se ven afectados por más variables (formación de espuma al inicio y pérdidas en los recipientes durante todo el proceso) comparados respecto a los cálculos de las tablas de solubilidad y recuperación de proteína (Tabla 2).

Con base en la Tabla 3, se puede deducir que la técnica ó el proceso en laboratorio presentó reproducibilidad, ya que se lograron rendimientos constantes ($P>0.05$). Además, es importante comentar que los concentrados de proteína obtenidos al final no presentaron el olor amoniacal, ni sabor amargo característico del músculo de *Dosidicus gigas*. Sin bien en este trabajo no se abordaron metodologías oficiales para evaluación sensorial, se puede decir que fue notorio que el concentrado final presento poco olor, sabor delicado y un atractivo color blanco. Esto se debió a que los compuestos indeseables de nitrógeno no proteico y ciertos péptidos responsables del olor amoniacal y sabor amargo permanecieron solubles en el agua al final del proceso (Sánchez *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que dichos rendimientos pueden cambiar (aumentar o disminuir) si se utilizan otras escalas, instalaciones, equipos, personal o cuidados diferentes a los usados en este trabajo.

También, se pudo recuperar más del 90% del agua utilizada en la homogenización y solubilización (Tabla 4) en ambos procesos. Esto se debe a que la precipitación iso-eléctrica fue eficiente al precipitar más del 90% de la proteína previamente solubilizada, y a su vez, que las proteínas fueron concentradas y aisladas durante todo el proceso, logrando así obtener agua al final del proceso con baja concentración de proteína soluble. Por lo anterior se propone que dicha agua pueda ser reutilizada sin problema alguno en los rendimientos, lo cual resulta en una atractiva ventaja adicional para que los procesos ácido y alcalino puedan ser utilizados a nivel industrial en regiones donde el agua es un recurso escaso. Hultin *et al.* (2005) proponen de igual manera que el agua al final de los procesos de pH *Shift* puede ser utilizada para nuevos procesos, lo cual permitirá optimizar el uso de este valioso recurso.

7.4 Composición de Proteínas por SDS-PAGE

7.4.1 Solubilidad de las Proteínas de calamar Respecto al pH

Como se observó en la Figura 6, las bandas de proteínas solubles de mayor intensidad se observaron en valores de pH extremos (pH 2.0-3.0 y pH 11.0-12.0). La menor presencia de bandas de proteínas se observa a pH 5.0, 5.5 y 6.0. Esto coincide con lo observado en la grafica de solubilidad (Figura 5). Este fenómeno se explica debido a que miosina, actina y paramiosina son las proteínas que en mayor proporción se encuentran en el músculo de calamar (Sikrosky, 1994), y la baja o alta solubilidad que poseen se refleja en los porcentajes de solubilidad total. La presencia de cabeza pesada de miosina (~205 kD), paramiosina (~108kD) y actina (~45 kD), se observa con mayor intensidad a los pH's 2, 3, 4, 10, 11 y 12 (Fig.6). Esto concuerda con los incrementos de solubilidad reportados en la Figura 5. De la misma manera ocurre a los pH 5, 5.5 y 6, ya que se observa que a estos pH's prácticamente la presencia de la cabeza pesada de miosina es nula, por su parte, paramiosina y actina presentan baja intensidad a pH 5.5 y 6. Esto tiene relación con los valores de menor solubilidad relacionados a los puntos iso-eléctricos de dichas proteínas. Los resultados mencionados coinciden con lo reportado por de la Fuente (2006) y Rocha (2006) en músculo de calamar. También Yongsawatdigul y Park, (2004) observaron similares resultados en músculo de pescado.

7.4.2 Solubilidad y recuperación de proteínas en los procesos ácido y alcalino

En la electroforesis realizada a las fracciones de los procesos ácido y alcalino (Figura 7), se puede observar como las proteínas miofibrilares son eficientemente solubilizadas desde el homogenizado inicial (A1 y B1). La presencia de cabeza pesada de

miosina (~205 kD), paramiosina (~108kD) y actina (~45 kD), se observa en el sobrenadante después de la 1^{ra} centrifugación (A2 y B2) y finalmente en el concentrado de proteína (A3 y B3). En el agua al final del proceso (A4 y B4) se observa la ausencia de bandas tanto de la cabeza pesada de la miosina como de todas las anteriores, esto se debe a que fueron eficientemente precipitadas y colectadas en el sedimento después de la segunda centrifugación. Este resultado concuerda con las bandas observadas en la curva de solubilidad (Figura 6).

El análisis de SDS-PAGE muestra que las fracciones de proteínas recuperadas no difieren en gran medida entre las recuperadas por los procesos ácido y alcalino. Tales resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Undeland *et al.*, 2002; Yongsawatdigul y Park, 2004, Kristinsson y Liang, 2006). Sin embargo, en el proceso alcalino se observan con mayor intensidad las bandas de proteínas que las obtenidas por el proceso ácido. Esto podría deberse a que se logró solubilizar o recuperar mayor cantidad de proteínas en el proceso alcalino (Tabla 2), si bien no existieron diferencias significativas en los porcentajes de proteína recuperada, el análisis de SDS-PAGE es una técnica lo suficientemente sensible para detectar ligeros aumentos en algunas fracciones.

Lo anterior también explica como en el agua restante al final del proceso alcalino (B4) se observan más bandas de proteína, esto debido a que en el proceso alcalino se solubilizan fracciones de proteína que logran permanecer solubles a pH 5.5 (Undeland *et al.*, 2002; Kristinsson *et al.*, 2005). En cuanto a la banda de actina, en el proceso ácido se logra solubilizar y precipitar más eficientemente que en el proceso alcalino, esto sucede muy probablemente, debido que a valores de pH ácidos logra desdoblarse y solubilizarse

mejor (Hubbard y Lazaries, 1979). Lo que sugiere que cuando se deseé una fracción específica se puede seleccionar el proceso más adecuado.

7.4.3 Análisis de SDS-PAGE en Condiciones Reductoras y No Reductoras

La presencia de polímeros se muestra evidente al observar moléculas de gran tamaño (>205 kDa) en condiciones no reductoras (Figura 8). La mayor diversidad de agregaciones de cabezas pesadas de la miosina se observan en el proceso alcalino. Se argumenta que los grupos SH de moléculas de proteína experimentan una reacción de oxidación, resultando en un entrecruzamiento vía enlaces disulfuro (Thawornchinsombut y Park, 2004). Si bien las proteínas de calamar experimentan agregaciones a pH ácido y alcalino, es evidente que dichas polimerizaciones se presentan con mayor intensidad y diversidad de tamaños en condiciones alcalinas. Como indica la Figura 8, estas agregaciones se originan desde la etapa de solubilización en el homogenizado inicial (A1 y B1), y permanecen hasta el concentrado de proteína final (A3 y B3). Dichos resultados son similares a los reportados en pescado rockfish (Yongsawatdigul y Park, 2004) y pacific whiting (Thawornchinsombut y Park, 2004). Estos resultados sugieren que los grupos SH se vuelven más susceptibles a ser oxidados a pH alcalino que a pH ácido, lo cual origina la polimerización vía puentes disulfuro, los cuales se mantienen estables hasta el final del proceso. Los agregados de baja intensidad presentes incluso en condiciones reductoras, aún se encuentra bajo investigación, sin embargo se discute que tales agregaciones son tan intensas, sobre todo en el proceso alcalino, que a pesar de ser expuestas a condiciones reductoras, aún quedan remanentes de polimerizados de gran tamaño.

Es recomendable que dichos resultados, sean corroborados y/o respaldados por otras técnicas relacionadas con el análisis de la superficie hidrofóbica de las proteínas por fluorometría y/o determinación de contenido total de grupos SH usando el reactivo de Ellman`s. Sin embargo, debido a los objetivos de esta investigación, estos no fueron llevados a cabo.

7.5 Capacidad y Estabilidad de Emulsión de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino

Con base a los resultados mostrados en la Figura 9, se evidenció que los concentrados de proteína a partir de músculo MC y CMC presentaron mayor capacidad de emulsión que los concentrados a partir de músculo M. Dichos resultados parecieran contradecir las evidencias comunes, ya que se sabe que la desnaturalización por congelación/molienda de las proteínas musculares de pescado y otras especies tiene un impacto perjudicial sobre las propiedades funcionales (Sikorski, 1994), ya que la desnaturalización frecuentemente resulta en cambios negativos en la funcionalidad de proteínas, tal es el caso derivado de la actividad enzimática que resulta en pérdida de diversas propiedades funcionales (Vissessanguan y An, 2000). Sin embargo, se ha comprobado que la desnaturalización de las proteínas puede mejorar las propiedades funcionales cuando se usa el proceso de pH *Shift* (Ingadottir y Kristinsson, 2003). Si bien, los tratamientos no tuvieron influencia sobre los porcentajes de solubilidad y recuperación de proteína funcional en los procesos ácido y alcalino; dichos tratamientos sí mostraron influencia en las propiedades funcionales.

Los fenómenos químicos que rigen la capacidad de emulsión y espumado son diferentes a los de solubilización, por tal razón las emulsiones y/o espumados, son llamadas propiedades de superficie. Las proteínas se adsorben o incorporan a interfases agua o/ aceite con múltiples puntos de contacto disminuyendo la tensión interfacial. El número de residuos o segmentos en contacto con la interfase es dependiente del grado de flexibilidad de la cadena polipeptídica, por lo cual, el desplegamiento y estructura de la superficie de las proteínas tendrán gran influencia en dichas capacidades funcionales (Nakai y Wayne, 1996)

Hasta la fecha no se conoce con certeza el arreglo estructural de las proteínas miofibrilares después de ser sometidas a los procesos ácido y alcalino, pero si se conoce que se puede favorecer la exposición de residuos hidrofóbicos gracias al desplegamiento y desnaturalización provocada por la solubilización a pH ácido y alcalino (Kristinsson y Hultin, 2003a,b).

Por las evidencias presentadas en este trabajo, se asume que los tratamientos MC y CMC generaron mayor desnaturalización o bien mayor despleglamiento en las proteínas musculares comparado con las proteínas del tratamiento M (Sikorski, 1994). Dicho desplegamiento en la estructura de las proteínas seguramente sufrió modificaciones en la solubilización a pH ácido y alcalino, incluso en la etapa de precipitación, sin embargo dichas diferencias en grados de desnaturalización pudieron prevalecer, resultando así, que los concentrados de proteína de los tratamientos MC y CMC presentaran mayor desplegamiento y flexibilidad. Lo anterior favoreció que estos presentaran mayor exposición de residuos hidrofóbicos que pudieron hacer contacto en la interfase agua-aceite y a su vez, mayor flexibilidad que favoreció la mejor capacidad y/o velocidad de adsorción

en la interfase (Kristinsson y Hultin, 2003a,b; Yongsawatdigul y Park, 2004) comparado con los concentrados del tratamiento M.

En cuanto al músculo de calamar del grupo control, este presentó menor capacidad de emulsión que los concentrados de proteína. Esto puede ser debido a los efectos negativos (agregaciones) provocados por las condiciones de congelación, ya que las proteínas al estar agregadas, no permiten que se expongan los residuos hidrofóbicos e incluso los hidrofílicos (Sikorski, 1994; Hultin *et al.*, 2005) para interactuar en la interfase agua-aceite. Por otra parte, la miosina se encuentra en mayor proporción en los concentrados de proteína, la cual juega el papel más importante en la emulsión debido a la prevalencia de residuos hidrofóbicos en la cabeza globular y la predominancia de residuos polares cargados en la cola fibrosa. Además, esta proteína presenta mayor capacidad de emulsión que el complejo actomiosina, proteínas sarcoplásmicas y actina en las mismas condiciones de concentración de proteína (Galluzzo y Regenstein, 1978).

También cabe mencionar, que a pesar de que el músculo de calamar presentó menor capacidad de emulsión, este pudo generar emulsiones cercanas a los valores de albúmina de huevo con un 15% de diferencia, con lo cual demuestra que las proteínas de calamar son resistentes a severas condiciones de congelación/molienda (Moral *et al.*, 1981; Moral *et. al.*, 2002). La albúmina de huevo mostró igual ($P>0.05$) capacidad de emulsión que los concentrados M y menor capacidad ($P<0.05$) respecto a los concentrados del músculo MC y CMC. Esto demuestra que los concentrados de proteína de calamar de los procesos de pH *Shift* pueden ser candidatos viables para ser utilizados comercialmente en la elaboración de productos alimenticios.

Se observó estabilidad similar de la emulsión formada en todas las muestras (Figura 10), lo cual indica que los filmes generados en la interfase no permiten que la fase dispersa en gotas de aceite se una entre sí. Las interacciones de las proteínas con la fase dispersa no polar (aceite) y la fase continua (agua) se mantiene estable debido al balance adecuado entre la rigidez y la flexibilidad de los filmes formados en la interfase (Nakai y Wayne, 1996)

Los procesos ácido y alcalino influyen de manera similar en la capacidad de emulsión de los concentrados de proteína de calamar. Esto podría indicar que existe un balance similar entre residuos hidrofóbicos e hidrofílicos expuestos en la superficie de las proteínas concentradas y que el arreglo estructural de dichas proteínas es similar bajo ambas condiciones de proceso. Sin embargo, esto todavía está sujeto a más investigación.

7.6 Capacidad y Estabilidad de Formación de Espuma del Proceso Ácido y Alcalino

Con base a los resultados observados en la Figura 11 se evidenció que los concentrados de proteína a partir de músculo MC y CMC presentaron mayor capacidad de formación de espuma que los concentrados a partir de músculo M. Ya se mencionó que los procesos ácido y alcalino pueden disminuir eficientemente los efectos negativos y/o agregaciones provocados por la congelación/molienda (Hultin y Kelleher, 2002), e incluso se menciona que las proteínas de cefalópodos son resistentes a condiciones severas de congelación/molienda (Moral *et al.*, 1981; Moral *et al.*, 2002). Por lo anterior, no es raro encontrar que las proteínas de músculo bajo tales tratamientos (MC y CMC) presenten propiedades funcionales.

En general, las proteínas que más rápido se adsorben o penetran a la interfase aire-líquido durante el espumado o batido, y experimentan mayor desplegamiento y arreglo molecular en la interfase, exhibirán mejor formación de espuma que aquellas proteínas que se resistan a dichos arreglos moleculares, o bien que sean menos flexibles (Nakai y Wayne, 1996).

El hecho de que los concentrados a partir de músculo de calamar MC y CMC presentaran mayor capacidad de espumado que el tratamiento M, se puede explicar de manera muy similar a lo planteado en el apartado 7.5, pues los tratamientos MC y CMC generaron mayor desnaturalización o desplegamiento en las proteínas musculares si se compara a las proteínas M. Se piensa que la diferencia en grados de desnaturalización prevaleció a pesar de los procesos ácido y alcalino, dando como resultado que los concentrados de proteína de los tratamientos MC y CMC presentaran mayor desplegamiento y flexibilidad favoreciendo a que estos exhibieran mayor área de superficie hidrofóbica, pero sobre todo, mayor flexibilidad para favorecer la rápida adsorción en la interfase agua-aire (Nakai y Wayne, 1996).

Contrario a la capacidad de emulsión, el músculo de calamar como control, presentó mayor capacidad de formación de espuma que los concentrados de proteína obtenidos del proceso ácido y alcalino. Esto hace suponer la influencia de otras proteínas presentes en el músculo, que están favoreciendo la formación de mayores volúmenes espuma (Mantrige *et al.*, 1999), o bien, la mayor formación de burbujas.

Contrario a la emulsión, en el espumado se discute en mayor medida sobre la estabilidad de la espuma, más que en la formación de la misma. Ya que otros factores adicionales influyen sobre la estabilidad de los filmes formados en la interfase aire-líquido

como lo son: 1) la rigidez del filme, 2) viscosidad, 3) flexibilidad y 4) goteo de líquido a través del filme. También, la presión tanto interna como externa de la burbuja influye enormemente en la estabilidad del espumado (Wilde y Clark, 1996).

De acuerdo a la Figura 12, se observa que los concentrados de los tratamientos MC y CMC presentaron menor estabilidad de espuma que el tratamiento M. Dicho patrón de estabilidad es contrario al de formación de espuma. Esto no es extraño, ya que los aspectos que determinan la capacidad de formación de espuma, son diferentes a los relacionados con su estabilidad, por ejemplo, una proteína puede tener excelente capacidad espumante, pero baja estabilidad de espuma (Wild y Clark, 1996). Los concentrados de calamar MC y CMC, lograron formar mejor espuma, sin embargo, debido a su mayor flexibilidad y desnaturalización de su superficie, sus filmes en la interfase no fueron lo suficientemente rígidos ni viscosos para mantener las burbujas de aire separadas. En cambio, los concentrados de calamar M al presentar menor desnaturalización y/o despleglamiento en su estructura, esta fue más rígida, logrando estabilizar mejor el sistema al formar un filme más cohesivo y continuo (Wild y Clark, 1996). De tal forma, que la flexibilidad pareciera ser importante para la capacidad de formación de espuma y la rigidez molecular juega un rol importante en la estabilidad de la misma, por lo tanto, para que una proteína sea una excelente candidata para generar espumas abundantes y estables, esta necesita tener un adecuado balance entre flexibilidad y rigidez estructural (Nakai y Wayne, 1996; Wild y Clark, 1996).

En cuanto a los valores de espuma de albúmina de huevo, tanto los valores de espumado de los concentrados, como el de calamar control, fueron mucho más bajos. Lo cual hace pensar, que no serían tan buenos candidatos como agentes espumantes como lo

serían como agentes emulsificantes. Sin embargo, de acuerdo a lo valores de estabilidad, la mayoría de los concentrados presentaron espuma igual o más estable que la formada por albúmina de huevo. Esto coincide con lo mencionado por Bickerstaff (2005) donde la estabilidad de la espuma formada con proteínas de calamar es mayor que la de albúmina. De tal forma, que los concentrados de proteína de calamar y el músculo de calamar, podrían implementarse en alimentos donde sea de mayor interés la estabilidad de la espuma que la formación de la misma.

7.7 Capacidad de Gelificación de los Concentrados de Proteína del Proceso Ácido y Alcalino

Una de las propiedades funcionales de mayor importancia de las proteínas musculares es su capacidad de generar geles después de tratamiento térmico, donde la miosina juega un papel clave (Stone y Stanley, 1992), la cual gracias a su estructura fibrosa-globular puede formar fuertes y cohesivos geles. Es la interacción cabeza-cabeza de la miosina la que se cree inicia la gelificación durante la acción térmica, seguido de entrecruzamientos de las colas formando un sistema rígido tipo gel (Xiong, 1997).

Al realizar los análisis de perfil de textura, se observó que los geles del CP del proceso alcalino obtuvieron los valores significativamente más altos de dureza (Figura 13), fuerza de gel y cohesividad (Tabla 5) en comparación con los geles de los CP del proceso ácido, esto en ambos tratamientos (CM y MC). El hecho de que los CP del proceso alcalino sean más fuertes, podría deberse a la formación de entrecruzamientos covalentes entre las cabezas de miosina vía puentes disulfuros generados en condiciones alcalinas (Figura 8), incluso es posible que en el proceso alcalino se haya logrado mayor retención de la cadenas

pesadas de la miosina (Undeland *et al.*, 2002). Tal formación de enlaces disulfuro (S-S) intermoleculares contribuye a la formación de largas cadenas polipeptídicas, las cuales favorecerán entrecruzamientos más extensos, continuos y cohesivos en la gelificación térmica (Matsumura y Mori, 1996). Kim *et al.* (2003) también reportaron mayor fuerza de gel en la proteínas de merluza tratadas a pH 11.0, esto debido a la formación de enlaces disulfuro de las proteínas miofibrilares durante la solubilización alcalina. Por su parte Choi y Park (2002) y Yongsawatidgul y Park (2004) reportaron que los geles de CP del proceso alcalino presentaron mejor calidad de gel en comparación con los CP del proceso ácido. Thawornchinsombut y Park (2003), evidenciaron que el proceso alcalino provoca la formación de extensas agregaciones de miosina vía puentes disulfuros, lo cual generaba geles con mayor fuerza. De tal forma, que las condiciones alcalinas podrían ser utilizadas como una estrategia efectiva para favorecer los enlaces disulfuro y polimerizaciones de proteínas en la elaboración de productos tipo gel.

En dicho análisis también se hicieron comparaciones entre los concentrados de proteína de los procesos de *pH shift* y el músculo de calamar sin procesamiento. Se encontró que bajo una misma formulación, los geles de los CP de proceso ácido y alcalino mostraron significativamente mayor dureza, fuerza y cohesividad que los geles de músculo de calamar. Las proteínas miofibrilares, especialmente el complejo actomiosina, contribuyen en la cohesividad y fuerza de los geles de proteínas musculares. Los CP de ambos procesos presentan mayor proporción de proteínas miofibrilares funcionales, es decir, miosina y actina se encuentran más concentradas que en el músculo de calamar del sin procesamiento, por lo que la fuerza de gel de los CP se ve favorecida (Yongsawatidgul y Park, 2004). También se sabe que la cabeza de la miosina presenta una conformación más

desplegada o desdoblada al ser sometida a los procesos ácido y alcalino en comparación con las proteínas de músculo sin procesarse (Kristinsson, 2001), lo cual favorece que estas sean más flexibles para interactuar y entrecruzarse con otras proteínas al momento en que se lleven a cabo fuerzas de atracción y repulsión durante la gelificación térmica. Por lo anterior, resulta ventajoso el uso de los procesos ácido y alcalino sobre las proteínas de músculo de calamar, ya que se pueden obtener CP con mejores propiedades de gelificación, en coincidencia con lo reportado en las patentes de Hultin *et al.* (2000) y Hultin y Kelleher (2002).

En cuanto a los parámetros de CRA y prueba de doblado, se encontró que tanto los CP y el músculo de calamar presentan resultados favorables, ya que estos lograron retener casi el 100% del agua y alcanzaron los valores más altos en la escala de prueba de doblado, aunque el músculo de calamar sin procesamiento presentó los valores más bajos en esta última prueba. Resultados similares fueron reportados por de la Fuente (2006) y Rocha (2006).

Según lo observado en la Figura 13, los geles de CP del proceso ácido respondieron de manera similar a los tratamientos, lo cual podría indicar que los CP de calamar MC y CM mantienen un arreglo estructural similar, o bien, que ambos logran generar sistemas tridimensionales similares después de la gelificación térmica. Particularmente, el proceso alcalino respondió de diferente manera ante los tratamientos, resultando en mayor dureza y fuerza los geles del CP de músculo CM. Al parecer la menor desnaturalización de las proteínas de calamar del CM generaron sistemas más rígidos y cohesivos después del tratamiento térmico en comparación con las proteínas de músculo MC, ya que estas últimas pudieran presentar estructuras más desplegadas y/o

desnaturalizadas (Shenouda, 1980), que finalmente generarán sistemas menos estables después de la gelificación térmica. Kristinsson y Hultin (2003a) mencionan que la miosina es parcialmente desplegada y desnaturalizada de manera diferente por cada uno de los procesos ácido y alcalino, lo cual podría reflejar las distintas respuestas bajo dichos tratamientos. Lo anteriormente expuesto se encuentra sujeto a ser corroborado por futuras investigaciones, ya que los mecanismos químicos y cambios estructurales ocurridos bajo tales condiciones aún se encuentran en espera de ser elucidados.

La implementación de los procesos ácido y alcalino permite obtener concentrados de proteína funcional a partir de músculo congelado bajo diferentes tratamientos, lo cual ya fue discutido en apartados anteriores, donde pone de manifiesto que los posibles efectos negativos de la combinación molienda-congelación pueden ser mitigados por los procesos de pH *Shift*, lo cual coincide con lo reportado en las patentes de Hultin *et al.* (2000) y Hultin y Kelleher (2002).

VIII. CONCLUSIONES

Las proteínas de músculo de calamar con diferentes tratamientos (M, MC, y CMC) presentaron un patrón similar de solubilidad, alcanzando la mayor solubilidad a pH 3.0 y pH 11.0, y la menor a los pH entre 5.0-6.0.

Las proteínas musculares de calamar fueron solubilizadas y precipitadas en rendimientos similares, donde los procesos ácido y alcalino no presentaron diferencias significativas al recuperar el 77.8% de proteína en promedio al final del proceso. Lo cual demuestra atractivos rendimientos para la industria.

Se evidenció que a pesar de que las proteínas musculares de calamar fueron sometidas a “severas” condiciones y/o combinaciones de congelación-molienda, éstas pueden ser solubilizadas y recuperadas eficientemente al implementar los procesos ácido y alcalino.

El análisis por SDS-PAGE mostró un patrón de proteínas solubles muy similar en ambos procesos, indicando que las proteínas miofibrilares de interés funcional (miosina, paramiosina y actina) son concentradas al solubilizarlas eficientemente a pH 3.0 y pH 11.0, y precipitándolas a pH 5.5. A su vez, el proceso de solubilización alcalina genera posibles polimerizaciones covalentes entre las moléculas de miosina vía formaciones de enlaces disulfuro (S-S), lo cual tuvo repercusiones en las propiedades de gelificación.

Se evidenció que con la implementación de los procesos ácido y alcalino es posible obtener concentrados de proteína de calamar con excelente funcionalidad (emulsión y gelificación) de materias primas que hayan sufrido tratamientos de molienda, congelación o almacenamiento prolongado en congelación.

Los concentrados de proteína presentaron mejor capacidad de emulsión y gelificación que el músculo de calamar sin procesar. En cuanto a la capacidad de espumado, esta no fue mejor que los controles.

Se recuperó más del 90% del agua al final de ambos procesos, la cual podría ser reutilizada en nuevos procesos.

En ambos procesos se obtienen concentrados de proteína que responden funcionalmente de manera similar en la mayoría de los casos. Sin embargo, este trabajo solo expuso un acercamiento sobre las ventajas y resultados de implementar los procesos de pH *Shift* sobre músculo de calamar gigante. Es necesario y recomendable realizar

experimentos más profundos en el futuro, que generen evidencias que ayuden a explicar y entender de manera más detallada, los cambios y fenómenos químicos ocurridos en las proteínas musculares de calamar bajo tales condiciones de procesamiento.

Por último se concluye, que los procesos ácido y alcalino son estrategias viables y atractivas para ser utilizadas en el procesamiento de músculo de calamar gigante. Esto, al obtener concentrados de proteína funcional útiles en la elaboración de productos de interés comercial y con alto valor. Estas alternativas tecnológicas, presentan altos rendimientos y son opciones útiles para fomentar el aumento del valor agregado del calamar gigante, lo cual es urgente tomando en cuenta el estado crítico que presenta la industria pesquera en nuestros días.

IX. PERSPECTIVAS

Sin bien, los procesos ácido y alcalino son estrategias tecnológicas viables y atractivas para ser utilizadas en el procesamiento de músculo de calamar gigante, aun existen diversos aspectos por abordar que ayuden a fortalecer las bases del conocimiento científico sobre los fenómenos que ocurren dentro de los procesos de *pH shift*; ya que el entender a fondo los fenómenos químicos y cambios estructurales de las proteínas de músculo de calamar, nos ayudará a mejorar y optimizar la recuperación de proteína y la funcionalidad de los concentrados de proteína. Todo proceso puede optimizarse si se tiene el conocimiento necesario para hacerlo. A su vez, la generación de conocimiento científico siempre fortalecerá las bases tecnológicas.

En caso de implementarse dichos procesos en una aplicación real, se tendría que elegir alguno de ellos: proceso ácido o proceso alcalino. Es necesario se realice un

escalamiento a planta piloto para corroborar la viabilidad y rentabilidad del proceso. Por otra parte, la implementación del proceso de *pH shift*, es solo una parte del todo, ya que también es de suma importancia evaluar la estabilidad funcional de las proteínas recuperadas bajo diferentes condiciones de almacenamiento. Todo producto necesita un empaque, una presentación y condiciones de comercialización. Los concentrados de proteína de calamar tendrán que ser procesados o manipulados de una manera particular dependiendo de la aplicación o uso que se tenga planeado para los mismos, es decir, las consideraciones que se utilicen para manejar un concentrado de proteína en polvo liofilizado o secado en horno de vacío, no serán las mismas si éste se necesita húmedo para elaborar productos tipo gel-emulsificado o surimi. Finalmente, aun si se tuviera el mejor proceso para maximizar el valor del calamar gigante, pero no existieran las condiciones intelectuales, financieras y políticas adecuadas, no se podría llevar a cabo una aplicación real de tecnología.

A lo que nos referimos, es que este trabajo fue solo un acercamiento para evaluar la viabilidad de dichos procesos basado principalmente en los rendimientos que estos otorgan y en la evaluación de las propiedades funcionales de los concentrados de proteína obtenidos bajo diferentes condiciones. De tal manera, que si se tuviera interés en abordar una aplicación real, será necesario considerar seriamente otros factores diversos fuera de lo abordado por este trabajo de investigación.

X. REFERENCIAS

- Anderson, E.J. y M.E. Demont. 2000. The mechanics of locomotion in the squid *Loligo pealei*: locomotory function and unsteady hydrodynamics of the jet and intramantle pressure. *J Exp Biol* 203: 2851-2863.
- Association of Official Analytical Chemists. 1984. *Official Methods of Analysis*, 14th Ed. The Association: Arlington, VA.
- AOAC. International. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. Association of official Analytical Chemists. 1995. Washington, D. C. pp 1094.
- Ayensa, M., Montero, A. Borderías y Hurtado J. 2002. Influence of some protease inhibitors on gelation of squid muscle. *J Food Sci* 67: 1636-1641.
- Badui, D. S. 1999. *Química de los Alimentos*. Tercera Edición. Ed. Pearson Education. México. pp. 180-182.
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. 2004. *Food Chemistry*. 3rd. Edition. Ed. Springer. Germany. Pp 61-63.
- Bickerstaff, G. 2005. University of Paisley. Functional properties of proteins <http://www-biol.paisley.ac.uk/Courses/Enzymes/glossary/Function.htm>,
- Bourne, M. C. 1978. Texture Profile Analysis. *Food Technol.* July. 62-66, 72
- Choi, Y. J. y Park, J. W. 2002. Acid-Aided Protein Recovery from Enzyme-Rich Pacific Whiting. *Journal of Food Science*. 67, 2962-2967.
- Cortés Ruiz, J.A., Pacheco Aguilar, R.; García Sánchez, G. y Lugo Sánchez, M. E. 2001. Functional Characterization of Protein Concentrate from Bristly

Sardine Made Under Acidic Conditions. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Vol. 10(4):5-23.

- Damodaran, S. 1996. Amino Acids, Peptides and Proteins. En *Food Chemistry*; O. R. Fennema, Ed.; Marcel Decker: New York,; pp 321-429.
- Davenport, M. P. y Kristinsson, H. G. 2003. Low and High pH Treatments Induce a Molten Globular Structure in Myosin Which Improves Its Gelation Properties. IFT Annual Meeting, Chicago; Abstract 42-9.
- de la Fuente Betancourt M.G. 2006. Tesis Doctoral: Caracterización de Propiedades Funcionales de Proteína Cruda e Hidrolizada de Manto de Calamar Gigante *Dosidicus gigas*. CIBNOR, La Paz, B.C.S.
- De la Rosa, M., J. T. Silva, V. M. García Tirado y García Peña S. 1992. El calamar una pesquería en desarrollo. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca.
- Ezquerro Brauer, J.M., Haard, N.F., Ramírez O., R., Olivas Burrola, H. y Velázquez Sánchez, C.J. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *J. Food Biochem.* 26, 459-475.
- FAO, 2003. Species identification sheets. FAO/SIDP Species Identification and Data Programme.
<http://www.fao.org/figis/servlet/FiRefServlet?ds=species&fid=2721>

- Galluzzo, S.J. y Regenstein, J.M. 1978. Role of chicken breast muscle proteins in meat emulsion formation: myosin, actin, and synthetic actomyosin. *J. Food Sci.* 43, 1761-1765.
- Gómez Guillen, M.C., Matínez Alvarez, O. y Montero, P. 2003. Functional thermal gelation properties of squid mantle proteins affected by chilled and frozen storage. *J. Food Sci.* Vol 68:1962-1967.
- Gómez Guillén, M. C., Hurtado, J. L., y Montero, P. 2002. Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle. *J. Food Sci.*, Vol. 67, Num. 4.
- Gomez Guillen M. C. y Montero P.1997. Improvement of giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle gelation by using gelling ingredients. *Z. Lebensm Unters Forsch A.* 204:379-384.
- Gómez Guillén, M. C., Montero, P., Solas, M. T., y Borderías, A. J. 1998. Thermally induced aggregation of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle proteins. Physicochemical contribution of added ingredients. *J. Agric. Food Chem.*, (46) 9, 3440-3446
- Hall, G.M. 1996. Basic concepts. En: *Methods of testing protein functionality*. G. M. Hall ed. Blackie Academic & Professional, London. 1996, 266 pp.
- Hernández Herrera, A., E. Morales Bojórquez, M.A. Cisneros Mata, M. O. Nevárez Martínez y G.I. Rivera Parra. 1998. Management strategy for the giant squid (*Dosidicus gigas*) fishery in the Gulf of California, Mexico. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.* 39: 212-218.

- Hernández Herrera, A., E. Morales Bojorquez, M. O. Nevárez Martínez, A. Balmori y G. I. Rivera. 1996. Distribución de tallas y aspectos reproductivos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*, D'Orbigny, 1835) en el Golfo de California, México. *Ciencia Pesquera* 12:85-89.
- Hill, S.E. 1996. Emulsions. En: *Methods of testing protein functionality*. G. M. Hall ed. Blackie Academic & Professional, London. 266 pp.
- Hubbard B.D. y Lazarides E. 1979. Copurification of actin and desmin from chicken smooth muscle and their copolymerization in vitro to intermediate filaments. *J. Cell Biol.* 80: 166-82.
- Hultin, H. O. y Kelleher, S. D. 1999. Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source and Protein Composition. U.S. Patent 6,005,073, December 21.
- Hultin, H. O. y Kelleher, S. D. 2002. Protein Composition Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source. U.S. Patent 6,451,975, September 17, 2002.
- Hultin, H. O. 2002. Recent Advances in Surimi Technology. En: *Recent Advances in Marine Biotechnology*; M. Fingerman and R. Nagabhushanam, Eds.; Science Publisher, Inc.: Enfield, New Hampshire; pp 241-251.
- Hultin, H. O. y Kelleher, S. D. 2000. Surimi Processing from Dark Muscle Fish. In *Surimi and Surimi Seafood*; J. W. Park, Ed.; Marcel Dekker: New York; pp 59-77.

- Hultin, H. O., Kelleher, S. D.; Feng, Y. M., Kristinsson, H. G., Richards, M. P. y Undeland, I. A. 2000. High Efficiency Alkaline Protein Extraction. U.S. Patent 6,136,959, October 24.
- Hultin H.O, Kristinsson H.G., Lanier T.G y Park, J. W. 2005. Chapter 3: Process for recovery of functional proteins by pH shifts. En: Surimi and Surimi Seafood. Second Edition. Editado por Park, Jae W.
- Ingadottir, B. 2004. The Use of Acid and Alkali-aided Protein Solubilization and Precipitation Methods to Produce Functional Protein Ingredients from Tilapia. Thesis presented for the degree of Master of Science. University of Florida.
- Ingadottir, B. y Kristinsson, H. G. 2003. Acid and Alkali Unfolding and Refolding Strategies Improve the Foaming Properties of Egg Albumen. *IFT Annual Meeting, Chicago*; Abstract 42-2.
- INP. 1999. Informe Anual del Instituto nacional de Pesca. www.inp.mx
- Instituto Nacional de la Pesca. 2006. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo. SAGARPA. Pag 63-83.
- ITIS, 2004. ITIS Standard report page: *Dosidicus gigas*. www.itis.usda.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt
- Jaquet, N. y Gendron, D. 2002. Distribution and relative abundance of sperm whales in relation to key environmental features, squid landings and the distribution of other cetacean species in the Gulf of California, Mexico. *Mar Biol.* 141: 591-601.

- Kier, W.M. y Thompson, J.T. 2003. Muscle arrangement, function and specialization in recent coleoids. *Berliner Paläobiologische Abhandlungen* 03, 141-162
- Kim, Y.S., Park J. y Choi Y.J. 2003. New approaches for effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fisheries Sci.* 69: 1229-37.
- Konno, K., Young-je, C., Yoshioka, T., Shinho, P. y Seki, N. 2003. Thermal denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid Dosidicus gigas. *Fisheries Sci.* 69, 204-209.
- Kristinsson, H. 2001. Conformational and functional changes of hemoglobin and myosin induced by pH: Functional role in fish quality. Ph D. Thesis, University of Massachusetts, Amherst, MA.
- Kristinsson, H. G. y Crynen, S. 2003. The Effect of Acid and Alkali Treatments on the Gelation Properties of Sarcoplasmic and Myofibrillar Proteins of Channel Catfish. *IFT Annual Meeting, Chicago*; Abstract 87-3.
- Kristinsson, H. G. y Demir, N. 2003. Functional Fish Protein Ingredients from Fish Species of Warm and Temperate Waters: Comparison of Acid and Alkali-Aided Processing Vs. Conventional Surimi Processing. *Advances in Seafood Byproducts, Fairbanks, AK*; Alaska Sea Grant College Program.
- Kristinsson, H. G. y Hultin, H. O. 2003. (a) Effect of Low and High pH Treatment on the Functional Properties of Cod Muscle Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5103-5110.

- Kristinsson, H. G. y Hultin, H. O. 2003. (b) Changes in Conformation and Subunit Assembly of Cod Myosin at Low and High pH and after Subsequent Refolding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7187-7196.
- Kristinsson, H.G., Theodore, A. E., Demir, N., y Ingadottir B. 2005. A Comparative Study between Acid-and Alkali-aided Processing and Surimi Processing for the Recovery of Proteins from Channel Catfish Muscle. *Journal of Food Sci.* Vol. 70, Nr. 4, C298-C306.
- Kristinsson, H. G. y Liang Y. 2006. Effect of pH-Shift Processing and Surimi Processing on Atlantic Croaker (*Micropogonias undulates*) Muscle Proteins. *Journal of Food Science*. Vol. 71, Nr. 5, C304-C312.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Liang, Y. y Hultin, H.O. 2005. Effect of pH on sedimentation of cod (*Gadus morhua*) muscle membranes. *J. Food Sci.* 70, C164-C172.
- Lin, T.M. y Park, J.W. 1998. Solubility of salmon myosin as affected by conformational changes at various ionic strengths and pH. *J. Food Sci.* 63:215-8.
- Llunch, M.A., Pérez Munuera, I. y Hernando. 2000. Protein in food structures. En: *Chemical and Functional Properties of Food Proteins*. Z.E. Sikorski ed. Technomic Publishing. Pennsylvania, USA. 412 pp.
- Macgillivray, P. S., Anderson, E.J., Wright, M. E. Demont. 1999. Structure and mechanics of the squid mantle. *J Exp Biol.* 202, 683-695.

- Mackie, I. M. 1994. Fish Protein En: *New and Developing Sources of Food Proteins*; B. J. F. Hudson, Ed.; Chapman and Hall: New York; pp 95-143.
- Markaida U. 2005. El Calamar Gigante del Golfo de California. Pesquerías artesanales en la frontera sur: *estrategias para la supervivencia*. Revista Ecofronteras. Num. 25. Pag.: 21-24.
- Markaida, U. y Sosa N. 2003. Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda:Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. J. Mar. Ass. U.K. 83:4162/1-16.
- Matringe, E., Phan Tan, R., y Lorient, D. 1999. Functional properties of milk-egg mixtures. J. Food Science. Vol. 64, No. 5, 787-791.
- Melendo, J.A., Beltran, J.A. y Roncales, P. 1997. Tenderization of squid (*Loligo vulgaris* and *Illex coindetii*) with bromelain and a bovine spleen lysosomal-enriched extract. Food Res Int. 30(5): pp.335-341
- Moral, A, Tejada, M. y Borderias, A.J. 1981. Frozen stored behavior of squid (*Loligo vulgaris*). Refrig Sci Technol 4:325-32.
- Morales, J., Ruiz Capillas, C. y Montero, P. 2002. Muscle protein solubility of some cephalopods (pota and octopus) during frozen storage. J. Sci Food Agric 82:663-8.
- Nakai Shuryo y Wayne Modeler, H. 1996. Food proteins: properties and characterization. New York, USA.

- Nigmatullin, C.M., Nesis, K. y Arkhipkin, A. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fisheries Res. 54: 9-19.
- Orbigny. 1835. *Ommastrephes gigas*, in 1834-1848, Voy. Amer. Merid., 5(3):50
- O'Shea, 2007. Cephalopod Science forums. www.tonmo.com/science/public/giantsquidfacts.php
- Paredi, M. E. and Crupkin, M. 1997. Biochemical Properties of Actomyosin from Frozen Stored Mantles of Squid (*Illex argentinus*) at Different Sexual Maturation Stages. J. Agric. Food Chem., 45, 1629-1632.
- Pour-El, A. 1981. Protein Functionality: classification, definition and methodology. En: protein functionality in foods. Cherry, J.P. Ed. American Chemical society Symposium series 147, W. D. C., pp 1-20.
- Ramirez Olivas, R., Rouzaud Sández, O., Haard, N.F., Pacheco Aguilar, Rr, y Ezquerra Brauer, J.M. 2004. Changes in the firmness and termal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). European Food Res. Technol. 219(4):312-315.
- Reporte de Mercado de Calamar (*Dosidicus gigas*) en México. 2004. Panorama Acuicola Magazine. http://www.panoramaacuicola.com/noticia.php?art_clave=606
- Rocha Estrada J.G. 2006. Propiedades funcionales de proteína de aleta y manto de calamar gigante *Dosidicus gigas*. Tesis de licenciatura. ITLM. Los Mochis, Sinaloa.

- Ruiz Capillas, C., Moral, A., Morales, J. y Montero, P. 2003. Characterization and functionality of frozen muscle protein in Volador (*Illex coindetii*), Pota (*Todaropsis eblanae*) and Octopus (*Eledone cirrhosa*). Journal of food science, Vol. 68, Nr. 7, 2164-2168.
- Sánchez Alonso I., Careche M. y Borderías A. J. 2007. Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. Food Chemistry. Vol 100, 48–54.
- Sánchez Brambila, G.Y., Alvarez Manilla, G., Soto Cordova, F., Lyon, B.G., y Pacheco Aguilar, R. 2004. Identification and characterization of the off-flavor in mantle muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) from the Gulf of California. J. Aq. Food Prod. Technol. 13(1):55-67.
- Senouda S.Y. 1980. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flash. Adv. In Food Res. 26: 275-311.
- Shawky, M.D., Hultin H.O. y Liang, Y. 2000. Solubility of Cod Muscle Myofibrillar Proteins at Alkaline pH. Journal of Aquatic Food Product Technology. Vol. 9 (4).
- Sikorski, Z.E. y Kolodziejska, I. 1986. The composition and properties of squid meat. Food Chem. 20, 213-224.
- Sikorski, Z.E. 1994. Seafood Proteins. Ed. Chapman and Hall, New York, EUA. Pag. 99-107.
- Smith, L.L. 1987. Functional and biochemical changes in deboned turkey due to frozen storage and lipid oxidation. J. food Sci., 52:22.

- Stefansson, G. y Hultin, H. O. 1994. On the solubility of Cod Muscle Proteins in Water. *J. Agri. Food Chem.* 42, 2656-2664.
- Stone, A. P. y Stanley, D. W. 1992. Mechanism of fish muscle gelation. *Food Res. Int.* 25, 381-388.
- Suda, A. 1973. Development of fisheries for non convencional species. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 30: 2121-2158.
- Suzuki, T. 1981. Kamaboko (fish cake). Pages 62-191 in *Fish and krill protein processing technology*. T. Suzuki, ed. Applied Science Publishers Ltd, London.
- Thawornchinsombut, S. y Park, J.W. 2004. Role of pH in Solubility and Conformational Changes of Pacific Whiting Muscle Proteins. *Journal of Food Biochemistry*. No. 28, 135-154.
- Theodore, A., Kristinsson, H. G. y Crynen, S. 2003. The Effect of pH and Salt on the Gelation Properties of Catfish Surimi and Catfish Protein Isolates from Acid and Alkali-Aided Processing. *IFT Annual Meeting, Chicago*; Abstract 76A-10.
- Torten, J. y Whitaker, J. R. 1964. Evaluation of the Biuret and Dye-Binding Methods for Protein Determination in Meats. *Journal of Food Science*, 29, 168-174.
- Undeland, I. A., Kelleher, S. D. y Hultin, H. O. 2002. Recovery of Functional Proteins from Herring (*Clupea harengus*) Light Muscle by an Acid or

Alkaline Solubilization Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7371-7379.

- Vissessanguan, W., y An, H. 2000. Effects of Proteolysis and Mechanism of Gel Weakening in Heat-Induced Gelation of Fish Myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1024-1032
- Vojdani, F. 1996. Solubility. En: Methods of testing protein functionality. G. M. Hall ed. Blackie Academic & Professional, London., 266 pp.
- Wilde, P.J. and Clark, D.C.. 1996. Foam formation and stability. En: Methods of testing protein functionality. G. M. Hall ed. Blackie Academic & Professional, London. 266 pp.
- Xiong, Y. L. 1997. Structure-Function Relationship of Muscle Proteins. In *Food Proteins and Their Applications*; S. Damodaran and A. Paraf, Eds.; Marcel Dekker: New York; pp 341-392.
- Xiong, Y. L. 2000. Meat Processing. En: *Food Proteins, Processing Applications*; S. Nakai and H. W. Modler, Eds.; Wiley-VCH: New York, pp 89-145.
- Xiong, Y. L. y Blacnchard, S. P. 1994. Dynamic Gelling Properties of Myofibrillar Protein from Skeletal Muscles of Different Chicken Parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 670-674.
- Yongsawatdigul, J. y Park, J. W. 2003. Thermal Denaturation and Aggregation of Threadfin Bream Actomyosin. *Food Chemistry*. 83, 409-416.

- Yongsawatdigul, J. y Park, J.W. 2004. Effects of Alkali and Acid Solubilization on Gelation Characteristics of Rockfish Muscle Proteins. *J. food Sci.*,Vo. 69, Nr. 7. C499-C505.