



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL
NOROESTE, S.C

Programa de Estudios de Posgrado

**Proteína de manto de calamar gigante gigante (*Dosidicus gigas*):
almacenamiento y procesamiento**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Ma. Gabriela de la Fuente

B e t a n c o u r t

La Paz, B.C.S., diciembre de 2006

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 9:30 horas del día 30 del Mes de Noviembre del 2006, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Proteína de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) :
almacenamiento y procesamiento"**

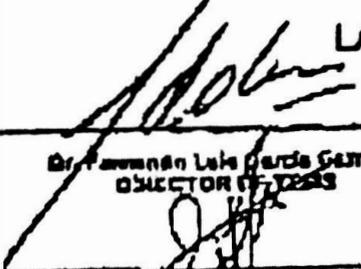
Presentada por el alumno:

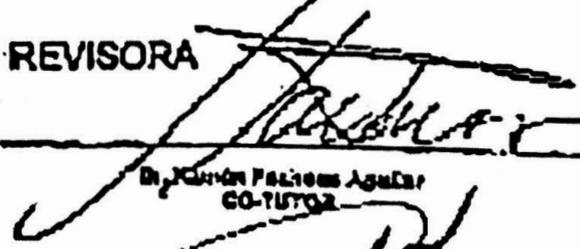
María Gabriela de la Fuente Betancourt

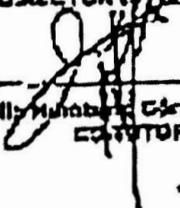
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA.

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su APROBACION DE LA TESIS, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

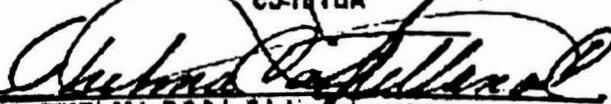

Dr. Fernando Luis García Gamella
DIRECTOR DE TESIS


Dr. Juan Pacheco Aguilar
CO-TUTOR


Dr. Julia Humberto Cárdena Cervela
CO-TUTOR


Dr. César Augusto Estévez Aranda
CO-TUTOR


Dra. Elna Alda Peña Ramos
CO-TUTOR


DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

El músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) se exporta como materia prima. Se le ha descrito con reducidas propiedades funcionales originado por la actividad proteolítica endógena, sin mencionar las condiciones de manejo post captura, lo cual nos llevó a investigar las propiedades funcionales de organismos recién capturados y como se afectan durante el almacenamiento y el procesamiento.

Se evaluó el efecto de fuerza iónica y pH en la solubilidad de las proteínas, alcanzando una recuperación de >90% de proteína en un intervalo de pH entre 9 y 12. Es posible obtener geles de calamar sin congelar y con manto previamente congelado con fuerza de gel de 43 ± 5.5 N y 46.4 ± 7.5 N, respectivamente.

Se evaluó el efecto de almacenamiento en hielo (0°C) sobre el perfil de proteínas, sus propiedades funcionales (solubilidad, formación de gel, emulsión y espuma) y sobre el arreglo de las fibras musculares del manto. Aunque las fibras musculares de manto almacenado en hielo se separan, los atributos de textura de geles térmicos no se afecta significativamente. La máxima fuerza de geles de calamar fue de 23.25 N (vs 1.5 N reportado) y con la máxima calidad doblado es decir que no se rompe al ser doblado en cuadrantes. La solubilidad de las proteínas aumentó en más de 40% y la capacidad de formar espuma incrementó de 81 a 162% durante el almacenamiento en hielo.

Se propusieron diferentes condiciones de obtención de hidrolizados de proteína de manto de calamar después de haber estudiado el efecto de temperatura y pH sobre las propiedades funcionales de las proteínas del manto. La solubilidad y capacidad de formar emulsión disminuyen significativamente a temperaturas mayores a 50 °C, mientras que la formación de espuma se favorece a esa temperatura. Las tres propiedades funcionales se ven afectadas por el pH; la formación de espuma es mayor a ambos extremos de la escala de pH, como ocurre con la solubilidad. A pH 9 se obtiene una emulsión con textura similar a mantequilla. La actividad enzimática a las condiciones estudiadas endógena es despreciable, no afecta a las propiedades funcionales y permite tener un mejor control durante la hidrólisis enzimática. Las proteínas de calamar tienen propiedades funcionales comparables a otras proteínas ya usadas en industria. Se recupera más de 80% de proteína soluble por hidrólisis con papaína además mejora la formación de espuma. La formación de emulsión es baja, pero puede mejorarse a pH 9, lo que además mejora su estabilidad. Los hidrolizados obtenidos con adición de papaína, presentan mayor formación de espuma y recuperación de proteína que los obtenidos usando alcalasa. La capacidad de formar emulsión no fue significativamente diferente entre los hidrolizados obtenidos con las dos enzimas. Las propiedades funcionales formación de espuma (390%) y de emulsión (50%) y sus estabilidades (100 y 85%, respectivamente) sugieren que las proteínas del manto de calamar crudo puede utilizarse como ingrediente en productos alimenticios en donde estas propiedades son deseables.

Palabras clave: almacenamiento, calamar gigante, procesamiento, fibras musculares, hidrolizados de proteína de calamar, propiedades funcionales.

ABSTRACT

Jumbo squid is a marine resource, which is poorly processed and sold as raw material. In order to take advantage of this low-cost Mexican fishery product, new processes should be developed. Before an industrial process is proposed, protein properties as well as how they are affected by storage and operating conditions must be studied. Solubility at several ionic strengths (0 to 1.0), pH (2 to 13), and gelling capacity of jumbo squid (*Dosidicus gigas* d'Orbigny, 1835) muscle proteins were evaluated. Protein recovery was > 90% at pH 9-12. Autohydrolysis was evaluated and affected only sarcoplasmic proteins. Folding score was 5 on all gels. Strength was higher for thermal gels prepared from squid fin (50.2 ± 1.2 N) than that prepared from mantle (23.4 ± 2.5 N). There was no significant difference in gel strengths from previously frozen (46.4 ± 7.5 N) and never frozen samples (43 ± 5.5 N). Results on solubility and gel forming capacity of the proteins from mantle and fin of jumbo squid suggest that these properties can provide additional value to this resource.

Effect of iced storage of jumbo squid mantle with fin on gelling capacity and changes in protein fractions and functional properties of jumbo squid mantle protein during storage at 0 °C were assessed. Most values of texture variables in gels did not significantly change during storage. On average, they were: strength 65.07 ± 4.71 N; elasticity $68.14 \pm 5.3\%$, fracturability 52.97 ± 1.28 N and cohesiveness $36.6 \pm 0.1\%$. Protein solubility increased more than 40%. Whippability increased during storage for 16 days at 0 °C (81 to 162%), as did foam stability (73 to 94%). Results suggest that iced squid mantle protein is a suitable ingredient for food products where these functional properties are desirable. Muscle fibres of squid mantle undergo various changes during storage. At 0 °C, they are disrupted, whereas at -20 °C, they aggregate and develop empty spaces in the tissue.

Proteolytic systems for producing hydrolysates of jumbo squid proteins bearing adequate functional properties were developed following preliminary studies involving evaluation of pH and temperature. Effects of pH (8, 9, 10) and temperature (30, 35, 40 °C), using 2×3 factorial design, were evaluated on squid mantle hydrolysis. Alcalase and papain were tested on each treatment. Protein recovery, whippability, and emulsifying capacity of the hydrolysates were evaluated. Almost 80% of the proteins were recovered in water-soluble form after hydrolysis with papain at pH 10 at any of the three temperatures. The highest values of whippability ($245 \pm 17.7\%$), foam stability (100%), emulsion-forming capacity ($27 \pm 0.97\%$), and stability ($99.99 \pm 8.8\%$) were achieved with papain-produced hydrolysates. Results suggest that jumbo squid proteins can be recovered in a high-yield hydrolysis process with functional properties that are useful as emulsifiers or foam-producing ingredients in different food systems.

Keywords: functional properties, frozen and iced storage, operating conditions, squid protein hydrolysates, and squid muscle fibers

CONTENIDO	
ABSTRACT	iii
CONTENIDO	V
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS	VII
INTRODUCCIÓN	1
HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA	5
GRADO DE HIDRÓLISIS	7
PROPIEDADES FUNCIONALES	8
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS PARTICULARES	13
MÉTODOS GENERALES	14
Obtención de calamar	14
Propiedades funcionales	14
Evaluación de la capacidad de formar geles	18
Caracterización por SDS-PAGE	20
Obtención de fracciones de proteínas	21
Análisis estadísticos	23
CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL DE LAS PROTEÍNAS DEL CALAMAR	24
ANTECEDENTES	24

MATERIALES Y MÉTODOS	26
Preparación de pasta de calamar	26
Preparación de homogenizado de calamar	27
Composición química del manto de calamar	27
Composición de aminoácidos del manto de calamar	27
Principales proteínas en el manto de calamar	28
Separación de proteínas por fuerza iónica	28
Solubilidad de proteínas por pH.....	29
Actividad enzimática endógena	31
Auto-hidrólisis de calamar	31
RESULTADOS.....	32
Composición química y de aminoácidos del manto de calamar	32
Principales proteínas en el manto de calamar	33
Separación de proteínas por fuerza iónica	34
Separación de proteínas por pH	35
Actividad enzimática endógena	37
Autohidrólisis de proteína de calamar	38
DISCUSIÓN	38
CAPITULO II: CAMBIOS EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DE CALAMAR DEBIDOS AL ALMACENAMIENTO DEL MANTO	42
ANTECEDENTES	42
MATERIALES Y MÉTODOS	45
Obtención de muestra.....	45
Efecto de almacenamiento en hielo sobre la capacidad de formar gel	46
Efecto de almacenamiento en hielo sobre las propiedades funcionales y las fracciones de la pasta de calamar	46
Efecto de almacenamiento de manto de calamar sobre las fibras musculares.....	47
RESULTADOS.....	48
Capacidad de formar geles	50
Propiedades funcionales.....	51
Arreglo de fibras musculares	53
DISCUSIÓN	55
CAPITULO III: EFECTO DE PROCESAMIENTO EN LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEÍNAS DEL MANTO DE CALAMAR.....	59
ANTECEDENTES	59

MATERIALES Y MÉTODOS	61
Preparación de muestras.....	61
Efecto de la temperatura de proceso sobre las propiedades funcionales.	62
Efecto del pH de proceso sobre las propiedades funcionales.	62
Producción de hidrolizados.....	63
RESULTADOS.....	64
Efecto de la temperatura sobre las propiedades funcionales.....	64
Efecto del pH sobre las propiedades funcionales.....	65
Hidrólisis enzimática de proteína de calamar	67
Efecto de las condiciones de hidrólisis sobre las propiedades funcionales.	69
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	76
COMENTARIO FINAL.....	78
LITERATURA CITADA	79
ANEXOS.....	84
1. Manuscritos	84
2. Escritos de divulgación	85
3. Presentaciones gráficas.....	88
INDICE DE TABLAS	
Tabla I Composición química del manto de calamar gigante	32
Tabla II. Efecto del almacenamiento en hielo sobre el área cubierta por fibras musculares. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).....	54
Tabla III. Propiedades funcionales de hidrolizados de calamar	72
INDICE DE FIGURAS	
Figura 1 Morfología básica del calamar, se indica también el sistema.....	1
Figura 2. Evaluación de la solubilidad de proteínas.....	15
Figura 3. Evaluación de la capacidad de emulsión.....	16
Figura 4. Evaluación de la capacidad de formar espuma.....	17
Figura 5. Representación gráfica de los atributos de textura registrados en el análisis de perfil de textura (APT).	20
Figura 6. Marcadores moleculares de peso molecular. a) SDS-PAGE del kit 17-0615-01. b) SDS-PAGE del kit 17-0446-01. Ambos kits de GE Healthcare Bio-Sciences Corp.	21
Figura 7. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en las fracciones de proteínas, modificación a partir de Hashimoto (1979).....	23

Figura 8. Procedimiento para solubilizar proteínas por cambio de pH.	30
Figura 9. Composición de aminoácidos de proteína de calamar: entera y la soluble en agua (sarcoplásmicas) comparado con otra especie (Ruiz-Capillas, <i>et al.</i> , 2003).	33
Figura 10. Principales proteínas de manto de calamar SQ es calamar, H y LMW son marcadores de peso molecular.	33
Figura 11. Efecto de la fuerza iónica en el perfil de solubilización de proteínas. Los números en los carriles representan la fuerza iónica para proteínas (a) solubles y (b) no solubles (sedimento suspendido en agua). Se indican M = miosina, P = paramiosina, A = actina.	34
Figura 12. Curva de titulación de las proteínas del manto de calamar	35
Figura 13. Curva de solubilidad como efecto del pH	36
Figura 14. SDS-PAGE (10%) de proteínas de calamar solubles a diferentes valores de pH (después de centrifugar a 12000 g, 20 min). Los números en los carriles corresponden a los valores de pH. Se indican M = miosina, P = paramiosina, A = actina.	36
Figura 15. Proteínas afectadas a diferentes pH. Los números en los carriles indican pH, el carril marcado con C es el homogenizado inicial.	37
Figura 16. SDS-PAGE (7.5-15%) de autohidrólisis de proteínas de calamar a pH fisiológico, 6 h, 50 °C; (a) total de proteínas; (b) proteínas en sobrenadante. Los números indican el tiempo de incubación (h).	38
Figura 17 Ruta de degradación post-mortem de ATP	43
Figura 18. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0 °C en las fracciones de proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas, estromales y compuestos nitrogenados no proteicos (NNP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).	49
Figura 19. Efecto del almacenamiento en el perfil de proteínas de calamar. Los números en los carriles corresponden al tiempo de almacenamiento. Se indican la miosina (M), paramiosina (P) y la actina (A). En el recuadro de línea punteada se indican las proteínas que cambiaron durante el almacenamiento.	49
Figura 20. Fracciones de proteínas miofibrilares (M) y sarcoplásmicas (S) de manto de calamar.	50
Figura 21 Efecto del tiempo de almacenamiento a 0 °C sobre los atributos de textura de gel de calamar homogenizado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).	51
Figura 22. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0 °C, sobre la solubilidad de proteína de calamar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).	52
Figura 23. Efecto de almacenamiento a 0 °C sobre la capacidad de formar espuma (W) y sus estabilidad (S). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).	52
Figura 24. Efecto de almacenamiento a 0 °C sobre la capacidad de formar emulsión (E) y su estabilidad (S). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$).	53
Figura 25 Efecto del almacenamiento sobre las fibras musculares de calamar (a) recién capturado; (b) después de 7 días a 0 °C; (c) después de 30 días a -20 °C	54
Figura 26. Fuerza de gel bajo diferentes condiciones y tejidos del calamar.	56
Figura 27. Efecto de la temperatura sobre las propiedades funcionales.	64
Figura 28. Efecto del pH en la solubilidad de proteínas de calamar a diferentes fuerzas iónicas.	65
Figura 29. Efecto del pH sobre la capacidad de formar espuma de las proteínas de calamar, en barras se muestra la estabilidad de la espuma.	66
Figura 30. Efecto del pH sobre la capacidad de formar emulsión de la proteína de calamar, en barras se muestra la estabilidad después de un tratamiento térmico.	67
Figura 31. SDS-PAGE (10%) de la hidrólisis de proteínas de calamar, DH 3%. (a) Alcalasa y (b) papaína. HMW y LMW marcadores de alto y bajo peso molecular. Los números en los carriles indican el tiempo de reacción (min).	68
Figura 32. Aminoácidos esenciales de proteína de calamar entera, soluble en agua e hidrolizada, se compara con recomendación de la FAO y con caseína.	69
Figura 33 Recuperación de proteína soluble después de la hidrólisis con alcalasa y papaína.	70
Figura 34. Efecto de pH y T en el grado de hidrólisis de calamar y caseína.	71
Figura 35 Efecto de pH y T de hidrólisis en las propiedades funcionales de los hidrolizados.	71

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante o “jumbo squid” (en inglés;(ITIS, 2004)) *Dosidicus gigas* (d'Orbigny, 1835 en 1834-1847) es un molusco nectónico que pertenece a la clase *Cephalopoda*, orden *Theuthida*, familia *Ommastrephidae* (Nigmatullin, et al., 2001). Los calamares son organismos de rápido crecimiento, su longevidad fluctúa entre 14 y 19 meses (FAO, 2003, INP, 1999, Nigmatullin, et al., 2001). Anatómicamente, el calamar está provisto de dos aletas musculares en forma de rombo, una cabeza en donde se encuentra la boca (o pico); un sifón, dos tentáculos, ocho brazos y su cuerpo de forma cilíndrica -denominado manto- (Figura 1). Se han reportado tres grupos de tallas (chica, mediana y grande), dentro de las tallas mayores los machos presentan 40-50 cm de longitud de manto, mientras que las hembras 55 a 65 cm, se presentan también registros de organismos capturados de más de 100 cm de longitud de manto (FAO, 2003, INP, 1999, Nigmatullin, et al., 2001).

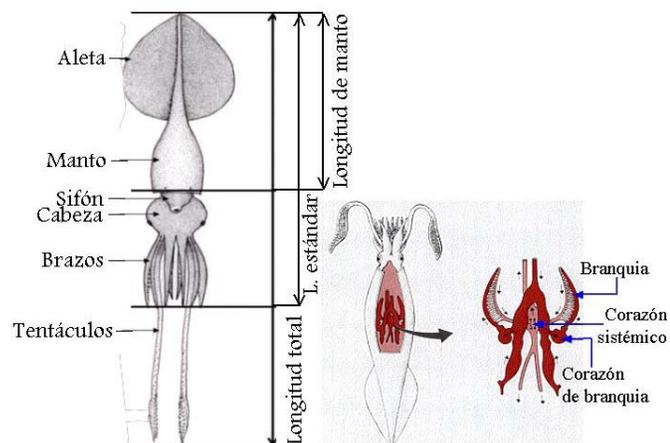


Figura 1 Morfología básica del calamar, se indica también el sistema

Es un organismo pelágico que se localiza desde la superficie hasta profundidades de 1200 m o mayores (Nigmatullin, et al., 2001). Este organismo se ubica a lo largo del Pacífico Este; desde la costa Californiana hasta la Patagonia, Chile. Dentro del Golfo de California, en la cuenca de Guaymas, esta especie migra moviéndose entre Guaymas y Santa Rosalía (Markaida, et al., 2005). Es en esta región del noroeste mexicano que la pesquería de calamar gigante ha sido muy importante por sus volúmenes de captura, a pesar de ser principalmente pesca artesanal (Markaida, et al., 2005).

La pesquería de *D. gigas* se inició en 1974 con una reducida flota artesanal que operó en el Golfo de California de mayo a agosto. En 1978 la flota camaronera se incorporó a la pesquería de clamar durante el verano. De 1979 a 1981 se tuvo una pesquería a gran escala en la que participaron diversos sectores: permisionarios libres, sociedades cooperativas, empresas privadas nacionales y extranjeras, y el sector paraestatal. A partir de 1982 y hasta 1987, las capturas redujeron drásticamente por ausencia del recurso, Las causas de esta ausencia no se definieron, sin embargo de asumió una relación a la sobrepesca y a condiciones ambientales desfavorables asociadas a “El Niño” (Klett, 1996 en Morales-Bojorquez, 2001; Jaquet and Gendron, 2002, Markaida, et al., 2005, Nigmatullin, et al., 2001). A partir de 1994, la población de calamar fue en aumento, provocando en respuesta un incremento en el esfuerzo de pesca, alcanzando en 1996 140 mil toneladas. Al principio de 1998 la captura total disminuyó de manera drástica, que se recuperó en 1999 (Jaquet and Gendron, 2002). Desde finales de 1999, con una captura de 57 mil 985 toneladas, el Instituto Nacional de Pesca ha considerado la captura del calamar como una pesquería con potencial de desarrollo (FAO, 2003, INP, 1999).

La historia de la pesquería de calamar gigante a partir de 1996 ha mostrado variabilidad en la capturas La irregularidad de la pesquería, mostrada en las constantes situaciones de incremento y disminución en las capturas, se debe principalmente a la combinación de dos factores: uno socio-económico derivado del bajo precio ofrecido a los pescadores; y otro biológico, por migraciones del calamar, las cuales a su vez se encuentran relacionadas a presencia-abundancia de alimento, a su biología reproductiva y a las variaciones climatológicas asociadas también a presencia de el fenómeno “El Niño”; (INP, 1999); (Nigmatullin, et al., 2001) (FAO, 2003).

A casi 30 años de pesca de calamar gigante, las principales presentaciones de venta son manto crudo (filete congelado) o como “daruma” (filete cocido y congelado) y cabeza congelada (INP, 1999, SEMARNAP, 2000). Aunado a lo anterior los intentos de industrialización del calamar se han visto limitados por varios factores, entre ellos las variaciones migratorias del recurso, así como la falta de conocimientos relativos a su fisiología y bioquímica *post-mortem*. A pesar de no contar con suficientes estudios para caracterizar a la especie como materia prima en ciencia y tecnología de alimentos, sí se han realizado algunos esfuerzos por generar productos con valor agregado. Un ejemplo reciente es el inicio de una producción de surimi de calamar para exportación en Santa Rosalía, B.C.S.. Sin embargo la escala de las plantas que se suman a este esfuerzo de procesar calamar es aún pequeña comparada con el volumen de la pesquería.

Para aprovechar mejor este recurso marino hay varios aspectos susceptibles de mejorar como son las condiciones de manejo post-captura y el desarrollo de tecnologías para la producción y transformación de alimentos basadas en calamar. Una

transformación e industrialización adecuada del calamar dependerá en gran medida de investigaciones orientadas a incrementar el conocimiento biológico y bioquímico del recurso. Los reportes en los que se intenta implementar procesos industriales utilizando el músculo de calamar como materia prima han caracterizado al músculo del calamar con reducidas propiedades funcionales, originado por actividad proteolítica endógena (Ezquerria-Brauer, et al., 2002) (Gómez-Guillén, et al., 2002, Gómez-Guillén, et al., 2003). Esta actividad proteolítica del músculo de calamar pudiera estar determinada por ciertas condiciones de temperatura y/o manejo, ya que en las investigaciones reportadas no se menciona las condiciones de manejo postmortem de los organismos estudiados para la evaluación de la actividad proteolítica y propiedades funcionales. Lo que obliga a evaluar organismos recién capturados y en condiciones de manejo post-captura apropiadas para definir las propiedades funcionales. Esta posibilidad es el eje de la hipótesis de la presente tesis.

Por otro lado, si la actividad proteolítica endógena es lo suficientemente alta, de tal manera que se lleven a cabo reacciones de autohidrólisis de manera casi espontánea, sería una situación ventajosa y se podría aprovechar para implementar procesos de recuperación de proteína soluble utilizando las enzimas propias del músculo. Algunas aplicaciones de la autohidrólisis se han reportado para *Illex illecebrosus* y *Loligo pealei* con los cuales se obtuvieron concentrados de proteína soluble que fue utilizada como ingrediente attractante en alimento para camarón (Lian and Lee, 2003, Lian, et al., 2005). Esto sugiere que la autohidrólisis sería un proceso adecuado para recuperar proteína de calamar gigante. En caso de que las enzimas endógenas no tuvieran suficiente actividad proteolítica, la recuperación de la proteína de calamar podría llevarse a cabo mediante la

adición de enzimas comerciales, que podrían adicionarse de forma pura o como extractos crudos (Gildberg, 1993).

En general, la hidrólisis enzimática es un proceso bioquímico que ha demostrado mejorar algunas propiedades funcionales principalmente la de solubilidad (Adler-Nissen, 1986, Gildberg, 1993). Los procesos de hidrólisis enfrentan diversos retos como la necesidad de desarrollos que, desde un punto de vista científico, propongan nuevas alternativas de equipos y condiciones en etapas separación y purificación que permitan economizar los procesos, o tratamientos a través de los cuales se recupere la proteína de especies marinas, fuentes de proteínas ricas en aminoácidos esenciales, con especial atención en especies de bajo valor comercial (Diniz and Martin, 1997, Martin, 1998) . Tal es el caso del calamar gigante *D. gigas*, que sería la materia prima ideal para procesos de hidrólisis que busquen utilizar fuentes de proteínas de bajo costo para transformarlas en productos de valor agregado. Por los estudios reportados sobre el calamar, pudiera ser factible implementar un proceso de autohidrólisis aunque esta autohidrólisis dependería de una mezcla de enzimas musculares que pudiera variar entre organismos; por lo que, la adición de enzimas sería preferible porque se tendría el control sobre la reacción. Siendo las condiciones de hidrólisis tema de estudio en este trabajo de tesis.

HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA

La hidrólisis enzimática ha sido utilizada por siglos, principalmente para alimentos tradicionales en Asia, en los cuales se usaban extractos crudos de las jugos de frutas para obtener productos tales como la salsa de pescado (Gildberg, 1993). Durante

la segunda guerra mundial sobrevino una crisis de alimentos, en cuanto a disponibilidad y en la forma de conservarlos; parte de la solución a esta carencia de alimentos fue la elaboración de concentrados de proteína y más adelante la obtención de hidrolizados. El ensilado por hidrólisis ácida y/o con adición de bacterias ácido-lácticas fue uno de los primeros procesos a través de los cuales se estabilizaba la proteína. Actualmente el ensilado es una opción para revalorar los desperdicios forrajeros y pesqueros (Diniz and Martin, 1997). Con el tiempo, los procesos de recuperación de proteína se fueron modificando hasta llegar a los actuales hidrolizados obtenidos con enzimas comerciales. El auge de producción de estos hidrolizados de proteína permitió que los procesos y condiciones de operación se optimizaran y que ahora se aprovechen para recuperar la proteína contenida en desperdicios de diferentes industrias como la pesquera, incluyendo aguas de desecho (Diniz and Martin, 1997, Gildberg, 1993, Kristinsson and Rasco, 2000).

En los últimos diez años las investigaciones se orientaron a demostrar que los hidrolizados de proteína poseen características con valor biológico como la presencia de péptidos promotores de crecimiento, antioxidantes, alergénicos, antibióticos, atractantes y anticancerígenos, entre otros (Córdova-Murueta and García-Carreño, 2002, Dziuba, et al., 1999, Peña-Ramos and Xiong, 2001). Las propiedades fisicoquímicas y por tanto los usos de los hidrolizados, dependerán de la enzima que se utilice, el grado de hidrólisis y las condiciones en las que se desarrolle la reacción (pH, temperatura, tiempo de reacción) (Dzwolak and Ziajka, 1999).

GRADO DE HIDRÓLISIS

La magnitud de la degradación proteolítica se puede monitorear a través del grado de hidrólisis (DH), definido como: el número de enlaces peptídicos separados (h) entre el número de enlaces peptídicos totales por unidad de peso (h_{tot}) expresado en porcentaje:

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

El DH también puede evaluarse mediante la ecuación de Adler-Nissen (1986), utilizando la metodología de pH-Stat, en la cual el grado de hidrólisis es directamente proporcional al consumo de base B :

$$DH(\%) = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100 \quad (2)$$

en donde N_B es la normalidad de la base, M_p es la masa de la proteína ($N \times 6.25$) y α es el promedio del grado de disociación de los grupos α -NH₂ y está dado por:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad (3)$$

en donde pK es el valor del pK promedio de los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis.

El grado de hidrólisis es importante para optimizar los parámetros de proceso y obtener un producto con propiedades funcionales requeridas. Una reacción de hidrólisis

prolongada, o sin control, daría origen a péptidos solubles tan pequeños que carecerían de funcionalidad. La hidrólisis de proteínas de origen marino se ha mencionado en diferentes artículos y patentes, y se sabe que mediante un cuidadoso control de sus condiciones y tiempo pueden mejorar las propiedades funcionales de las proteínas (Adler-Nissen, 1986, Clemente, 2002, Diniz and Martin, 1997, Gildberg, 1993).

PROPIEDADES FUNCIONALES

La funcionalidad de las proteínas es un aspecto muy importante en el área de alimentos, analizados desde puntos de vista académicos o comerciales. Las propiedades funcionales son cualquier propiedad excepto nutricional, de algún alimento o ingrediente que afectan su comportamiento durante la preparación, proceso, almacenamiento o consumo; y por tanto, influyen en su uso (Hall, 1996, Kijowski, 2001).

Algunas características de las proteínas u otros ingredientes en alimentos entre las que se incluyen hidratación, reología, y propiedades de superficie, darán origen, dependiendo de factores intrínsecos y externos, a las propiedades funcionales tales como solubilidad, capacidad de formar espuma, capacidad de emulsificación, retención de agua, capacidad de formar geles, cambios de viscosidad, entre otras (Hall, 1996, Kijowski, 2001).

El uso de la funcionalidad de las proteínas se reflejará, en parte, por su conformación natural (primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria). Por lo que el

conocimiento de la naturaleza biológica permitirá predecir las posibilidades de favorecer propiedades funcionales y nutricias para uso en alimentos. Por ejemplo, en la 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, determinarán propiedades como: solubilidad, hidrofobicidad de superficie y la habilidad de estabilizar espumas o emulsiones. El tamaño y naturaleza de las cadenas laterales determina la estructura secundaria y ésta a su vez, las posibles interacciones con el medio. Las interacciones hidrofóbicas son importantes en la estructura terciaria, las variaciones en el total de aminoácidos hidrofóbicos influirán en la estructura y por tanto en la funcionalidad (Hall, 1996, Kawai, et al., 1998).

La variabilidad de la forma y función biológica de las proteínas, está proporcionada por los complejos niveles de estructura; la conservación o modificación de la estructura determinará las aplicaciones funcionales en alimentos. Para lo cual también se deben considerar factores externos como: pH, fuerza iónica, temperatura, actividad de agua; y, dependiendo del proceso, tener consideraciones sobre el mezclado, tiempo para cuantificar estabilidad, así como la concentración de proteína (Adler-Nissen, 1986, Hall, 1996, Kijowski, 2001).

Algunas propiedades como solubilidad, formación de gel, capacidad de formar emulsión, y espuma, generan un interés particular en la industria de alimentos (Adler-Nissen, 1986). La solubilidad, que resulta de las propiedades de superficie activa, a su vez, es importante por su influencia sobre otras propiedades, como en la formación de

emulsión, de espuma y gelificación (Vojdani, 1996). Vista como un parámetro dentro de un proceso, la solubilidad se define como la retención de proteína en el sobrenadante obtenido después de centrifugar un sistema de una o dos fases.

La formación de gel es un fenómeno de agregación de proteínas en el cual se da un balance entre fuerzas hidrofóbicas e hidrofílicas formando una red tridimensional ordenada. 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 forma el arreglo (Matsumura and Mori, 1996).

La capacidad de formación de espuma se da por el carácter anfipático 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 (Wilde and Clark, 1996).

Una emulsión es una dispersión o suspensión de dos líquidos inmiscibles. Las emulsiones en alimentos pueden ser *agua en aceite*, como las margarinas; 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).

Recapitulando, el calamar gigante es la materia prima ideal para procesar y aprovechar sus posibles propiedades funcionales: alto contenido en proteína, bajo valor en el mercado y existe la presión, por parte de los pescadores, para procesarlo y darle así un valor agregado alto. La literatura existente respecto al tema, reporta el uso de manto congelado, sin un seguimiento adecuado del manejo post-captura, ni el efecto de ese manejo en las propiedades funcionales. El presente trabajo de investigación pretende demostrar que las propiedades funcionales del calamar gigante dependen principalmente del manejo *post-mortem* y no tan sólo por la presencia de enzimas proteolíticas endógenas en el músculo del calamar.

La organización de este trabajo se presenta en tres secciones principales:

- En la primera se detallan los materiales y métodos generales utilizados para el trabajo experimental.
- La segunda sección está dividida en tres capítulos, cada uno con su estructura básica: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusiones. Después de los tres capítulos se da una conclusión del trabajo completo. En el **primer** capítulo se presenta la información sobre la composición proximal y la de aminoácidos del manto de calamar, la separación de sus proteínas por pH y fuerza iónica, así como su actividad proteolítica endógena. En el **segundo** capítulo, se discute el efecto del almacenamiento a 0°C de manto homogenizado, sobre la composición de proteínas y sus propiedades funcionales: solubilidad de proteínas; capacidad de formar geles, emulsión y espuma; adicionalmente se da la información del efecto del almacenamiento en hielo (0°C) y congelación (-20°C) de manto entero, sobre el

arreglo de las fibras musculares. Este tipo de análisis de la estructura muscular es nuevo para el calamar gigante y da un punto de partida para estudios posteriores que relacionen estos cambios en las fibras con los cambios en los atributos de textura. En el **tercer** y último capítulo se analizan las propiedades funcionales de las proteínas del manto de calamar, como efecto de las condiciones de temperatura y pH durante el procesamiento. Esta información se aplicó a un proceso de hidrólisis, mediante enzimas comerciales adicionadas, para la recuperación de proteínas con mejoramiento de sus propiedades funcionales.

- La última sección es de anexos: los manuscritos sometidos correspondientes a cada capítulo, se incluyen ensayos y presentaciones gráficas (trípticos y carteles) que fueron resultados directos o indirectos de la investigación de tesis; también se anexa un resumen de una propuesta de proyecto de desarrollo de productos derivados de calamar para consumo humano.

HIPÓTESIS

La disminución de propiedades funcionales de las proteínas del manto de calamar gigante durante su almacenamiento o procesamiento, se debe a condiciones de manejo post captura inapropiadas.

Por lo que a partir de calamar manejado adecuadamente, es posible recuperar proteína de manto con propiedades funcionales útiles en sistemas alimentarios.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el manto de calamar gigante *D. gigas* con un manejo post captura en condiciones de almacenamiento ideales, como materia prima para la obtención de hidrolizados de proteína.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la composición proteica de manto de calamar gigante (*D. gigas*) y sus cambios durante almacenamiento.
2. Evaluar el efecto de refrigeración y congelación sobre el arreglo de las fibras musculares.
3. Evaluar la transformación de la proteína del manto de calamar gigante por autohidrólisis y por hidrólisis con adición de enzima.
4. Caracterizar los hidrolizados de proteína de manto de calamar.

MÉTODOS GENERALES

Obtención de calamar

Los experimentos fueron desarrollados utilizando calamares recién capturados. En la misma embarcación, inmediatamente después de ser sacados del agua, los calamares, fueron sumergidos en un baño de agua-hielo y mantenidos así hasta su llegada a tierra. Se seleccionaron organismos que tuvieran una longitud de manto homogénea, la cual fue de aproximadamente 50 cm. Ya en tierra, los organismos fueron limpiados, removiendo las vísceras y eliminando la cabeza con brazos. Los mantos con aleta se lavaron con agua corriente, y ya limpios se guardaron en bolsas de plástico que se colocaron entre camas de hielo y se mantuvieron así hasta llegar al laboratorio, dentro de las 16 h siguientes a la captura. En el laboratorio se limpiaron de nuevo, se removió y eliminó la piel y separaron los mantos de las aletas, se tomaron algunas porciones de los mantos y se mantuvieron empacados en bolsas de plástico colocadas entre camas de hielo para ser procesadas sin congelación previa para los experimentos que así lo requirieran, el resto de las muestras se empacaron de forma individual en bolsas de plástico y fueron guardadas en congelación a -20°C para posterior uso.

Propiedades funcionales.

Solubilidad

La solubilidad se evaluó como se describe en (Chobert, et al., 1988) con algunas modificaciones (Figura 2), como se detalla a continuación: se tomó una muestra de

pasta, la cual se homogenizó con agua o con solución de NaCl (fuerza iónica indicada en cada experimento) para obtener una concentración de proteína en la mezcla total de 10 g/l (evaluada por método de Kjeldahl). Este homogenado se mezcló vigorosamente por 3 minutos, en seguida se incubó a temperatura ambiente, manteniéndolo con agitación moderada durante 30 min, después la mezcla se centrifugó a 12000 g durante 20 min. La solubilidad se calculó evaluando el contenido de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry, et al., 1951). La solubilidad se expresa como el porcentaje de proteína solubilizada, respecto al total de la muestra.

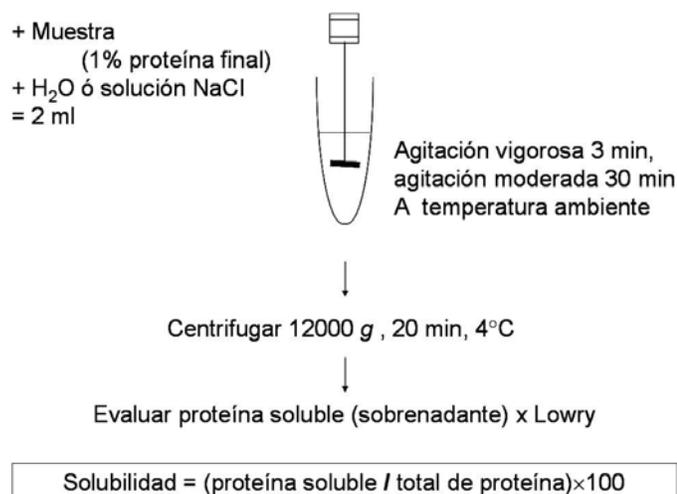


Figura 2. Evaluación de la solubilidad de proteínas.

Capacidad de formar emulsión

La **capacidad de emulsión** se determinó utilizando el método de Swift (Hill, 1996) con algunas modificaciones como se describe a continuación (Figura 3): en un vaso de plástico se colocaron 50 ml de un homogenizado de calamar, preparado con pasta de calamar y agua para obtener una concentración final de 3% de proteína. Se adicionaron 9 ml de aceite de girasol, y se agitó el sistema con un homogenizador utilizando un impulsor de propela, durante 30 s a máxima velocidad, en seguida se procedió a centrifugar a 2000 g, durante 5 min. La capacidad de emulsión se calculó como la relación de volumen de emulsión formada entre el volumen total de la mezcla, expresado en porcentaje. Después de someter la emulsión a un tratamiento térmico a 80°C, 30 min, se calculó la misma relación de volúmenes. La **estabilidad de emulsión** se expresó como el porcentaje de la capacidad de emulsión remanente después del tratamiento térmico.

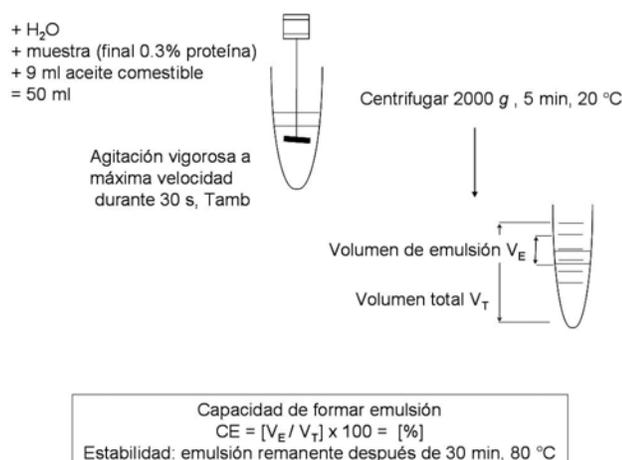


Figura 3. Evaluación de la capacidad de emulsión.

Capacidad de formar espuma

La formación de espuma y su estabilidad se determinaron utilizando una modificación al método de Rudin (Wilde and Clark, 1996). En un vaso de plástico se colocaron 100 ml de un homogenizado de calamar, preparado con pasta de calamar y agua para obtener una concentración final de 0.3% de proteína. Se agitó la mezcla utilizando un homogenizador de impulsor circular plano, durante 1 min, a máxima velocidad. Se registró el volumen de espuma formada y la capacidad de formación de espuma se expresó como la relación del volumen de espuma entre el volumen total inicial (100 ml), la estabilidad de la espuma se calculó como el porcentaje del volumen de espuma remanente después de 60 min de reposo a temperatura ambiente (Figura 4).

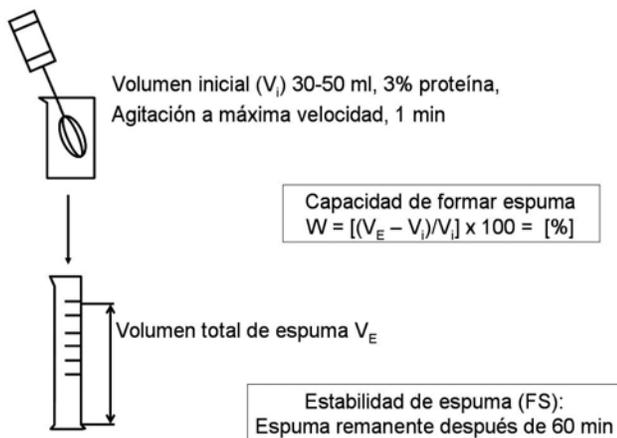


Figura 4. Evaluación de la capacidad de formar espuma.

Evaluación de la capacidad de formar geles.

Se le llama “sol” a una pasta homogénea de carne, mezclada con 2-3% (w/w) de NaCl. El “sol” tiene en promedio una concentración final de 0.43M NaCl y 85% de humedad. El “sol” de calamar se obtuvo de la siguiente forma: se preparó una pasta a partir de una mezcla de trozos de mantos de varios individuos, esta pasta se mezcló manualmente con 2.5% (w/w) de NaCl, y sin ajustar el contenido de humedad. Se tomaron alícuotas de 40 g del “sol” las cuales fueron vaciados en vasos de precipitado de 50 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” embolsados fueron sometidos a un tratamiento en un baño María, a 90°C e incubados durante 30 min. Posteriormente, se colocaron en un baño de agua-hielo (0-2°C) y se mantuvieron ahí durante 24, tiempo en el cual se concluye el tratamiento para formación de geles, a estos geles se les realizó la prueba de doblado y el análisis de perfil de textura (APT).

Para la prueba de doblado se cortaron secciones circulares (o rebanadas) de gel, con 30 mm de diámetro y 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), en la cual se designó 5 si 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 2.8 cm de altura y 3 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 25% de su altura original (compresión de 75%), esta compresión se realizó dos veces en un movimiento recíprocante que imitó la acción de la mandíbula de morder y masticar. Se generó una curva fuerza-tiempo (Figura 5) para cada gel preparado con “sol” de calamar bajo las condiciones indicadas en cada capítulo. Se evaluaron los atributos de textura: fuerza de gel (altura del primer pico en la gráfica resultante) que es la fuerza necesaria para comprimir el gel y representa la fuerza de la primera mordida; elasticidad (porcentaje de recuperación de altura) que es la capacidad del gel de recuperarse después 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.

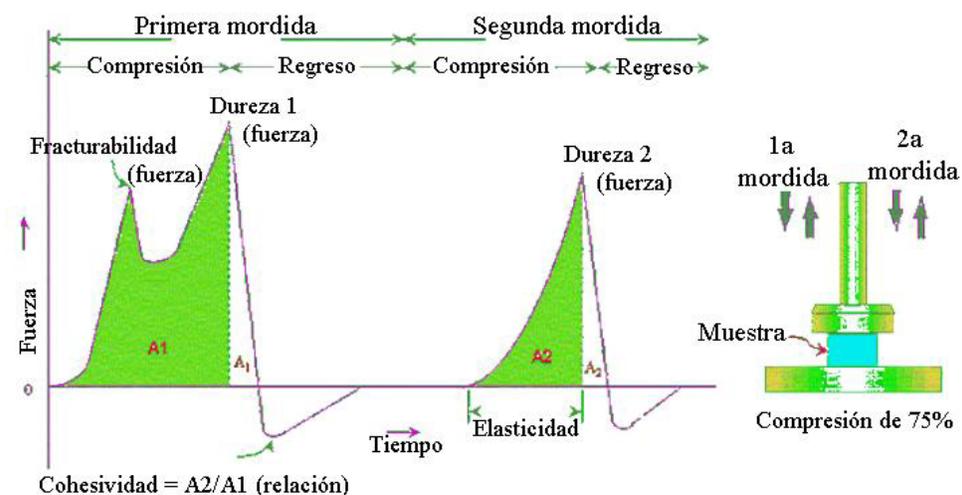


Figura 5. Representación gráfica de los atributos de textura registrados en el análisis de perfil de textura (APT).

Caracterización por SDS-PAGE.

Los perfiles de proteínas del manto de calamar, sometidas a los diferentes tratamientos, fueron analizadas por medio de electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras SDS-PAGE (Laemmli, 1970), para lo cual se utilizaron geles compuestos por un gel concentrador de 4% y un gel separador de 10%, en ciertos casos (donde se indique) se utilizaron geles separadores de de gradiente de 7.5 a 15%; en todos los casos, los geles tuvieron 1.5 mm de espesor. Las muestras, conteniendo 50 μg de proteína fueron mezcladas 1:1 con buffer de carga (0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% (v/v) glicerol, 0.2 M DTT, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8), después se mantuvieron en un baño María en ebullición por 5 minutos. La electroforesis se desarrolló en una unidad vertical (Hoefer, Inc, modelo SE 260), a corriente constante (13 mA por gel). Se utilizaron dos estándares de peso molecular (Figura 6): de 14 a 97 kDa (17-0615-01) y

de 53 a 220 kDa (17-0446-01, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., antes Amersham Pharmacia). 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%).

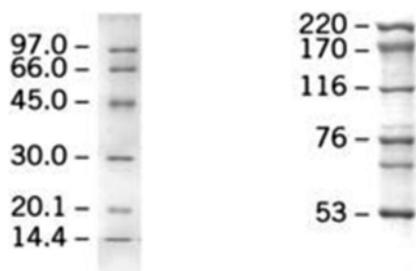


Figura 6. Marcadores moleculares de peso molecular. a) SDS-PAGE del kit 17-0615-01. b) SDS-PAGE del kit 17-0446-01. Ambos kits de GE Healthcare Bio-Sciences Corp.

Obtención de fracciones de proteínas.

Las fracciones de proteínas de calamar se separaron empleando una modificación a la metodología propuesta por Hashimoto (1979), como se describe a continuación (Figura 7): se tomó una alícuota de pasta de manto calamar y se mezcló con 10 volúmenes de agua destilada, esta mezcla se mantuvo con agitación constante dentro de un baño de hielo para lograr mantener la mezcla a una temperatura de 2-3°C, después de 30 min en agitación, la mezcla se centrifugó a 12000 *g* durante 20 min, a 4°C para separar la fracción soluble en agua (contenida en el sobrenadante) de la fracción no soluble (contenida en el sedimento). Al sedimento se le adicionó de nuevo el mismo volumen de agua que en el primer paso, se repitieron la agitación y centrifugación. Ambos sobrenadantes, que contenían los compuestos nitrogenados no proteicos y las

proteínas sarcoplásmicas se mezclaron y se guardaron como uno sólo a 0°C hasta su separación posterior. El sedimento restante contenía las fracciones miofibrilar y estromal, se mezcló con 10 volúmenes de NaCl 1M, se mantuvo en agitación constante dentro de un baño de hielo para lograr mantener la mezcla a una temperatura de 2-3°C, durante 30 min, posteriormente se filtró con una malla de plástico para obtener la fracción miofibrilar en la fase soluble, el tejido restante se mezcló y agitó de nuevo con 10 volúmenes de NaCl 1M, y se procedió a incubar y filtrar de la misma forma que en el paso anterior, las fases acuosas se mezclaron para obtener fracción miofibrilar y el tejido restante se consideró como la fracción estromal o tejido conectivo.

Al sobrenadante se le adicionó ácido tricloroacético (o TCA, a una concentración final de 5%), para separar las proteínas sarcoplásmicas y los compuestos nitrogenados no proteicos contenidos en la fracción soluble en agua, una vez adicionado el ácido, la mezcla se agitó vigorosamente durante 30 s, y enseguida se centrifugaron a 3000 g durante 5 min a 20°C. Después de centrifugar, en el sobrenadante quedaron los compuestos nitrogenados no-proteicos mientras que la fracción sarcoplásmica quedó en el sedimento, esta última fracción de proteínas se recuperó por adición de dos volúmenes de NaOH 0.1N. La concentración de proteína en cada fracción se evaluó utilizando el método de Lowry (Lowry, et al., 1951). El contenido de proteína en la fracción insoluble final, del estroma, se evaluó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

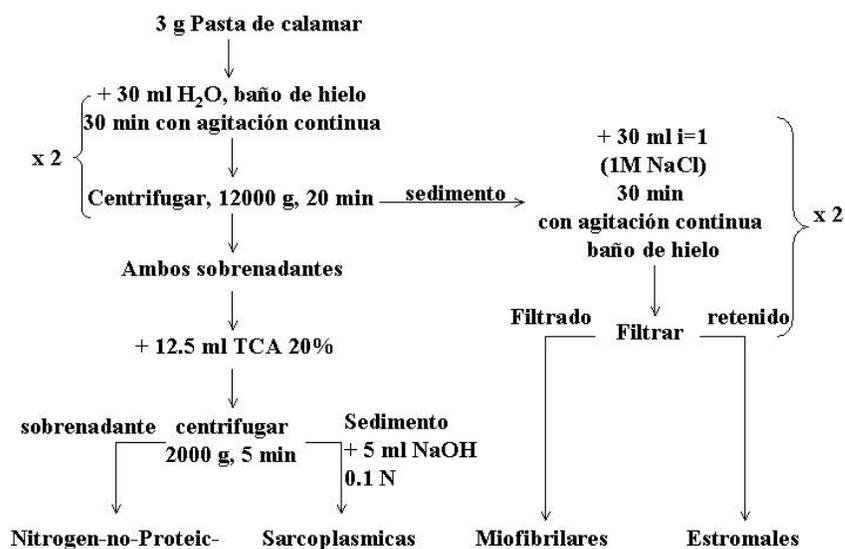


Figura 7. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en las fracciones de proteínas, modificación a partir de Hashimoto (1979).

Análisis estadísticos.

Los datos se reportan como el promedio de al menos tres replicas \pm SD. Se utilizó análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba de Turkey HSD para determinar diferencias significativas en los experimentos; un valor de ($P < 0.05$) se consideró significativo. El programa utilizado fue Statgraphics^R Plus v. 5.0 para Windows.

CAPITULO I: Caracterización bioquímica y funcional de las proteínas del calamar.

ANTECEDENTES

Las proporciones de las tres principales fracciones de proteínas musculares de calamar (sarcoplásmicas, miofibrilares y del estroma), difieren de aquéllas reportadas para peces, especialmente el colágeno, que es el principal componente de las proteínas del estroma, el cual puede constituir de un 3 hasta un 11% del total de proteínas, comparado con el 2% para peces. La fracción de proteínas sarcoplásmicas, representa cerca del 15 % del total de proteína del calamar (Ezquerro-Brauer, et al., 2002, Gómez-Guillén, et al., 2003, Sikorski and Kolodziejska, 1986). Las proteínas miofibrilares constituyen del 75 al 85% de las proteínas totales del músculo de calamar, las proteínas más representativas de la fracción miofibrilar son: la miosina (cadena pesada de 220 kDa), actina (45 kDa) y paramiosina (111 kDa), son. De las cuales la miosina la proteína más importante de las miofibrilares, no sólo por su actividad de ATPasa (Konno, et al., 2003), sino también por el interés que genera por sus aplicaciones en ciencia y tecnología de alimentos, con el inconveniente de ser una proteína muy sensible a la actividad proteolítica de enzimas musculares aunque éstas se encuentren en baja concentración o actividad (Konno, et al., 2003). Por otro lado, la paramiosina es característica de los músculos de invertebrados y en calamar puede representar cerca del 14% del total de las proteínas miofibrilares (Sikorski and Kolodziejska, 1986).

Una característica importante de la fracción de proteínas sarcoplásmicas es su gran actividad proteolítica que conduce a la degradación de las proteínas miofibrilares después de la muerte del organismo (Ezquerro-Brauer, et al., 2002, Gómez-Guillén, et al., 2003, Sikorski and Kolodziejaska, 1986). El manto de (*Loligo vulgaris*, *Illex coindetti*, *T. eblanae*, *D. gigas*), contiene varios tipos de proteasas que ocasionan autohidrólisis de las proteínas del músculo *post mortem* (Ayensa, et al., 2002, Gómez-Guillén, et al., 2002, Ruiz-Capillas, et al., 2003); con la consecuente pérdida de los atributos de textura del organismos –enteros, en rodajas o en filetes- durante el almacenamiento, o algún proceso como el cocimiento. En el manto de *D. gigas* se ha encontrado actividad proteolítica de diversos tipos, aunque no se han estudiado de manera individual las enzimas proteolíticas del manto, sí se ha reportado la actividad de los extractos crudos con diferentes sustratos y se encontraron actividades del tipo carboxipeptidasa, aminopeptidasa, azocaseinolítica, tripsina, y quimotripsina (Ezquerro-Brauer, et al., 2002).

La solubilidad de las proteínas de cualquier organismo, se ve afectada por las condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica. Estos cambios en las condiciones de reacción aplicados a un homogenado de músculo, permite la obtención de fracciones de las proteínas musculares por diferencia de solubilidad (Hashimoto, et al., 1979). Algunos estudios con vertebrados marinos han demostrado que al modificar el pH de una mezcla de proteínas de músculo incrementa la hidrofobicidad y la actividad interfacial (Kristinsson and Hultin, 2003), mejorando así las propiedades funcionales que

involucran interacciones hidrofóbicas como lo son la capacidad de formar emulsión y de formar geles. Para el caso particular de *D. gigas* son condiciones poco estudiadas y que deberán evaluarse si se pretende proponer cualquier proceso para recuperar y aprovechar su proteína. Para mejorar las propiedades funcionales de un homogenizado de proteínas musculares, es posible aplicar un tratamiento que involucre de manera secuencial o combinada, la modificación de pH con la modificación de fuerza iónica (Sánchez-Alonso, et al., 2007).

Para sentar las bases necesarias de las propiedades bioquímicas del músculo de calamar gigante, que permitan predecir comportamiento bajo ciertas condiciones, fue necesario caracterizar el músculo de calamar, por lo que los objetivos planteados para este capítulo fueron: evaluar la composición de las proteínas del manto de calamar gigante, medir su actividad proteolítica endógena; evaluar las condiciones de pH y fuerza iónica para la solubilidad de las proteínas del manto; y evaluar la capacidad de formar gel térmico de las proteínas musculares bajo diferentes condiciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de pasta de calamar.

Se tomaron pequeñas piezas cuadradas de aproximadamente 5 cm de varios mantos de diferentes individuos, estos trozos se colocaron en una licuadora y se disgregaron a máxima velocidad hasta formar una pasta lo más homogénea posible, lo

cual duró aproximadamente 30 s. Esta pasta se utilizaba dentro de los tres primeros días después de prepararla, y almacenada en hielo, a una temperatura de 0°C.

Preparación de homogenizado de calamar.

Se tomó una alícuota de pasta de calamar y se homogenizó con agua (o solución acuosa que se indique) El agua o solución acuosa se adicionó poco a poco para favorecer la disgregación de la pasta, para lo cual se utilizó mortero y pistilo, lo que permitió que la homogeneización fuera más eficiente y se previniera la formación de espuma.

Composición química del manto de calamar.

Se tomó una alícuota de la pasta de manto de calamar preparada como se describió anteriormente, para analizar la composición química (proteínas, humedad, cenizas y lípidos) de acuerdo a métodos oficiales (AOAC, 1995), otra porción se liofilizó para analizar el perfil de aminoácidos por HPLC (Vázquez-Ortiz, et al., 1995) como se describe enseguida.

Composición de aminoácidos del manto de calamar.

Se tomó una muestra de la pasta de manto de calamar y se liofilizó. El polvo obtenido se preparó de acuerdo a la técnica de Vazquez-Ortiz, *et al* (1995), para evaluación del contenido de aminoácidos; como se describe brevemente a continuación: se colocaron 10 mg de muestra deshidratada y se adicionaron 10 mg de ácido

tioglicólico en tubos de hidrólisis y se les adicionaron 3 ml de HCl 6N, los tubos se cerraron al vacío y se incubaron a 150°C durante 6 h, tiempo y temperaturas suficientes para hidrolizar toda la proteína contenida en la muestra. La mezcla de hidrólisis se evaporó a 65°C en un rotoevaporador. La muestra deshidratada se resuspendió en 3 ml de agua desionizada y se volvió a evaporar a las mismas condiciones, hasta sequedad. Después de la segunda evaporación la muestra se resuspendió en 1 ml de agua desionizada, posteriormente se filtró y se analizó la composición de aminoácidos por HPLC (Vázquez-Ortiz, et al., 1995).

Principales proteínas en el manto de calamar.

Se preparó una pasta con varios mantos de calamares recién capturados, se tomó una alícuota, se diluyó con agua destilada en una relación 1/11 y se evaluó el contenido de proteína por el método de Lowry (Lowry, et al., 1951), después se tomó una alícuota de la dilución y se mezcló con buffer de carga de electroforesis (o buffer muestra) de manera similar a como fue descrito en Materiales y Métodos Generales, para su caracterización por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Separación de proteínas por fuerza iónica.

Se tomó una alícuota de 1 g de pasta de calamar y se homogeneizó con agua destilada (denominada aquí fuerza iónica 0) o a diferentes fuerzas iónicas obtenidas con adición de NaCl, para obtener un volumen final de 10 ml. Las fuerzas iónicas evaluadas fueron 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1; en este caso el mismo valor numérico de fuerza iónica

correspondió al valor de la molaridad de la solución de NaCl empleada. El procedimiento fue disgregar con un pistilo la pasta de calamar en la solución utilizada, posteriormente se homogeneizaron incubándose durante 3 min a temperatura ambiente, mantenidas con agitación vigorosa en vortex. Enseguida se mantuvieron con agitación moderada dentro de un baño de hielo para mantener una temperatura aproximada de 0°C. Después de 30 min, las muestras se centrifugaron a 12000 g, a 4°C, durante 20 min. El sobrenadante fue recuperado y guardado a 0°C para usarse más adelante; mientras que el sedimento fue tratado con la misma solución (agua o de NaCl) que se adicionó en proporción 1:1 de la pasta muscular inicial. El botón del sedimento se disgregó manualmente y en seguida se agitó vigorosamente en vortex durante 2 min y enseguida se centrifugó a 12000 g, a 4°C, durante 20 min. Los sobrenadantes resultantes de la centrifugación se mezclaron para formar uno solo, al cual se le evaluó su contenido de proteína por el método de Lowry (Lowry, et al., 1951) y se analizó por SDS-PAGE. El sedimento final se resuspendió con agua (1 parte de músculo inicial por 0.5 partes de agua), se homogeneizó y se evaluó su contenido de proteína por el método de Lowry y se analizó por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Solubilidad de proteínas por pH.

Se realizaron dos experimentos para evaluar el efecto del pH en la solubilidad de las proteínas del manto de calamar. En el primero se construyó una curva de titulación de un homogenizado de calamar (1% proteína), adicionando HCl 10 N o NaOH 10 N. En el segundo experimento (Figura 8), se evaluó la solubilidad de las proteínas por una

modificación al método de (Chobert, et al., 1988) para lo cual se preparó un homogenizado de calamar (1% proteína). Se dividió en 13 porciones y a doce de ellas se les ajustó un valor de pH de 2 a 13, el valor de pH de la muestra sin ajuste de pH fue de 5.9, considerado como pH natural. Cada muestra a su respectivo pH, se mantuvo dentro de un baño de hielo ($\sim 3^{\circ}\text{C}$) con agitación constante. Después de 10 min de incubación el homogenizado se centrifugó a 12000 g, 4°C , durante 20 min. La concentración de proteína en el sobrenadante fue cuantificada por el método de Lowry (Lowry, et al., 1951). La solubilidad se expresó como el porcentaje de proteína soluble del total inicial en la muestra. Los homogenizados, con los diferentes valores de pH evaluados se mantuvieron hasta 60 min, se tomaron alícuotas del total de proteínas para analizar por electroforesis SDS-PAGE el efecto que cada pH tiene sobre el perfil de proteínas.

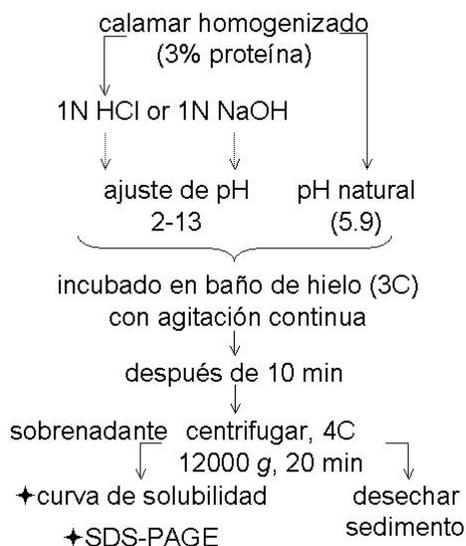


Figura 8. Procedimiento para solubilizar proteínas por cambio de pH.

Actividad enzimática endógena.

Se evaluó la actividad proteolítica del manto de calamar utilizando el método descrito en (Navarrete Del Toro and García-Carreño, 2002) con algunas modificaciones. La pasta se homogenizó con tres diferentes soluciones amortiguadoras: Tris-HCl 50 mM, pH 7.5; fosfatos 50 mM, pH 7.5 y McIlvaine, pH 6.5; la relación pasta:solución-amortiguadora fue 1:9. El sustrato utilizado fue azocaseína 0.5% (en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5); la reacción se desarrolló a temperatura ambiente (25°C) durante 10 min; y fue detenida con ácido tricloroacético (TCA) a una concentración final de 5%. Después se mantuvo 10 min a 0°C, se centrifugó a 10000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Los péptidos solubles liberados fueron evaluados por medición de absorbancia a 366 nm en un lector de microplacas (VERSAmax, Molecular devices). Una Unidad de Actividad (U) se define como el cambio en absorbancia a 366 nm por minuto, por mg de proteína en la mezcla de reacción.

Auto-hidrólisis de calamar

Un sistema de homogenizado de calamar (3% proteína) se incubó con agitación continua, a diferentes condiciones de temperatura y pH para evaluar el grado de autohidrólisis. Las temperaturas probadas fueron 25, 40 y 50°C, a pH 5.9 (fisiológico) y pH 8. Los ensayos se desarrollaron manteniendo el sistema hasta por 48 h, tomando muestra a diferentes intervalos. El cambio en el perfil de las proteínas como efecto de la autohidrólisis se analizó por SDS_PAGE. En replicas posteriores, las muestras tomadas a diferentes tiempos se dividieron en dos, una fue directamente mezclada con el buffer

muestra (de carga de electroforesis) y se mantuvo en un baño María en ebullición durante 5 min, después fue inyectada en el gel de electroforesis; mientras que la otra fue centrifugada (a 5000 g, durante 10 min), se evaluó la concentración de proteína en el sobrenadante, se tomó una alícuota de éste y se mezcló con el buffer muestra y se mantuvo en un baño María en ebullición durante 5 min, después se inyectó en el gel de electroforesis, la electroforesis de las muestras tratadas con ambos procesamientos se realizó simultáneamente con geles “gemelos”.

RESULTADOS

Composición química y de aminoácidos del manto de calamar

Los resultados del análisis proximal del manto de calamar, se muestran en la tabla I. En la figura 9 se muestra la proporción de los aminoácidos contenidos en el manto de calamar, se resaltan los aminoácidos esenciales y se comparan con los valores reportados para *Todaropsis eblanae*, otra especie comercial (Ruiz-Capillas, et al., 2003).

Tabla I Composición química del manto de calamar gigante

Componente	Manto (%)
Cal/100 g	5251.5 ± 0.33
Humedad	81.5 ± 0.06
Proteína cruda	14.95 ± 0.07
Cenizas	1.26 ± 0.028
Lípidos	0.18 ± 0.001

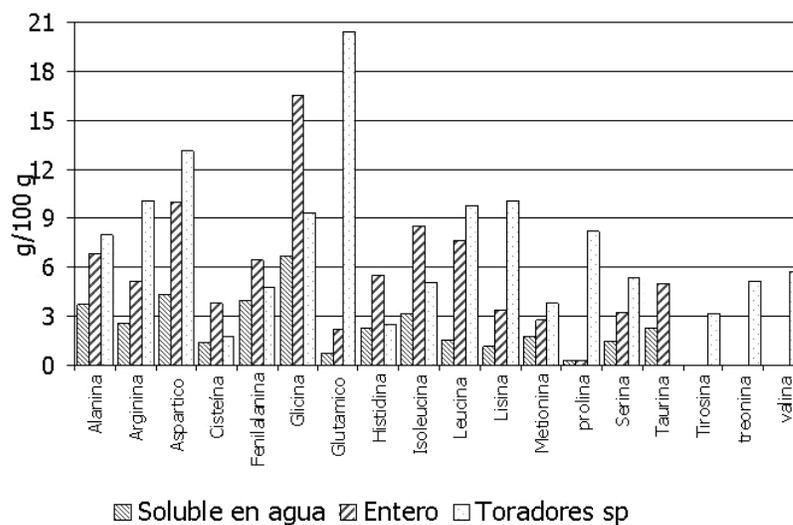


Figura 9. Composición de aminoácidos de proteína de calamar: entera y la soluble en agua (sarcoplásmicas) comparado con otra especie (Ruiz-Capillas, et al., 2003).

Principales proteínas en el manto de calamar.

Por medio de electroforesis (Figura 10) se identificó la cadena pesada de la miosina (220 kDa), paramiosina (111 kDa) y actina (45-53 kDa).

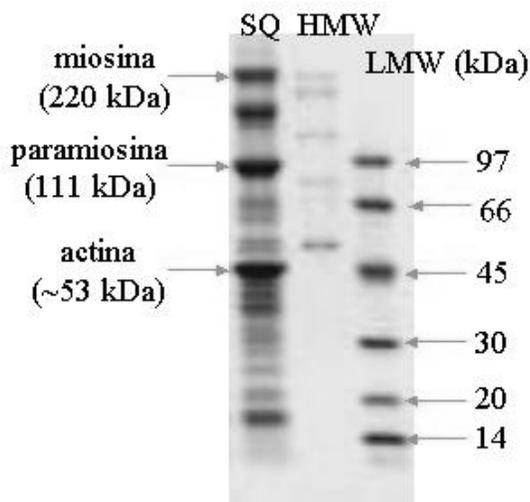


Figura 10. Principales proteínas de manto de calamar SQ es calamar, H y LMW son marcadores de peso molecular

Separación de proteínas por fuerza iónica

Las proteínas solubilizadas a diferentes fuerzas iónicas se muestran en la figura 11a, las proteínas del sedimento fueron suspendidas en agua y se muestran en la figura 11b. Cuando las proteínas extraídas con solución de fuerza iónica 1, tres fases se obtuvieron después de centrifugar: el sobrenadante, el cual contenía la proteína soluble, el sedimento que contenía la fracción no soluble y una tercera fase intermedia que también contenía proteína soluble, aparentemente con mayor viscosidad, y que se muestra por electroforesis como el carril “1b” (Figura 11).

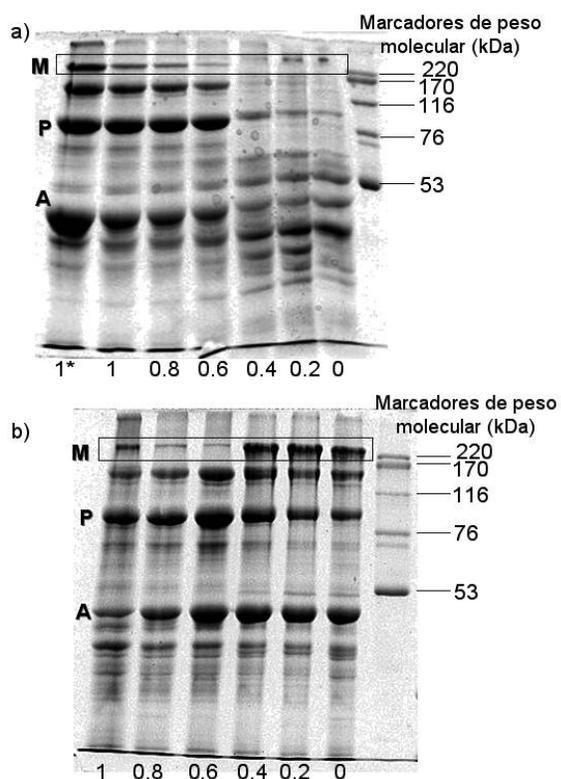


Figura 11. Efecto de la fuerza iónica en el perfil de solubilización de proteínas. Los números en los carriles representan la fuerza iónica para proteínas (a) solubles y (b) no solubles (sedimento suspendido en agua). Se indican M = miosina, P = paramiosina, A = actina.

Separación de proteínas por pH.

La curva de titulación de las proteínas de calamar se muestra en la figura 12, corresponde a la mezcla total de proteínas presentes en el manto de calamar. La primera parte de la curva corresponde a la adición de ácido y la segunda de hidróxido, ambas zonas partiendo del pH inicial del homogenizado (5.9). El efecto del pH sobre la solubilidad de las proteínas se presenta en la curva de solubilidad de la figura 13, el tipo de proteínas que se solubilizan a diferentes pH se muestra en la figura 14. Y el efecto del pH sobre el perfil de proteína se ve en la figura 15.

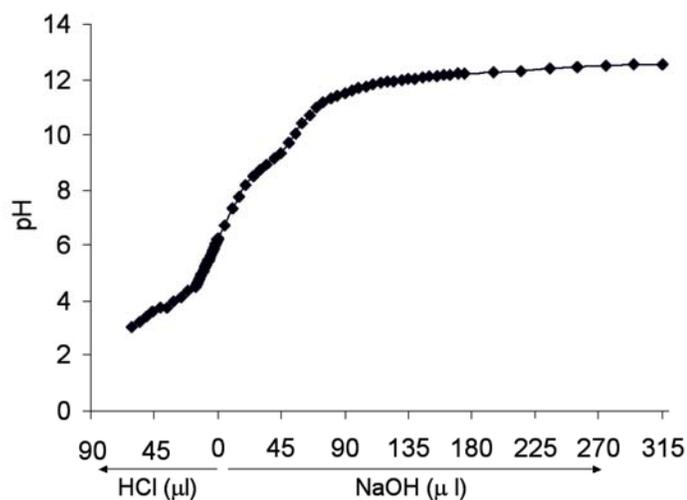


Figura 12. Curva de titulación de las proteínas del manto de calamar

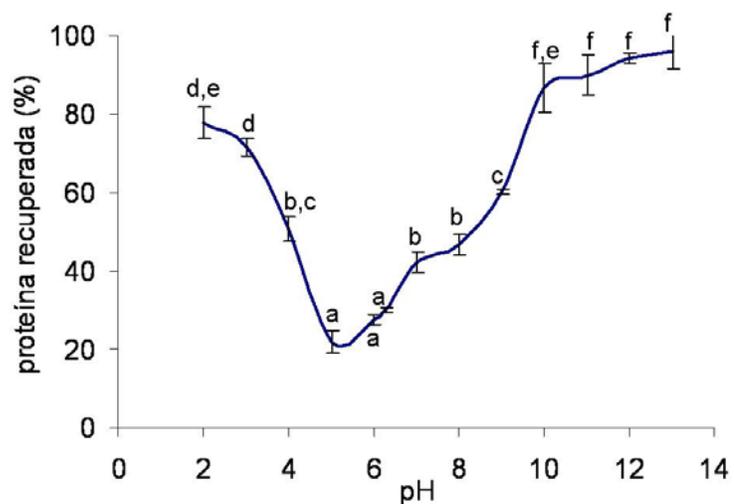


Figura 13. Curva de solubilidad como efecto del pH

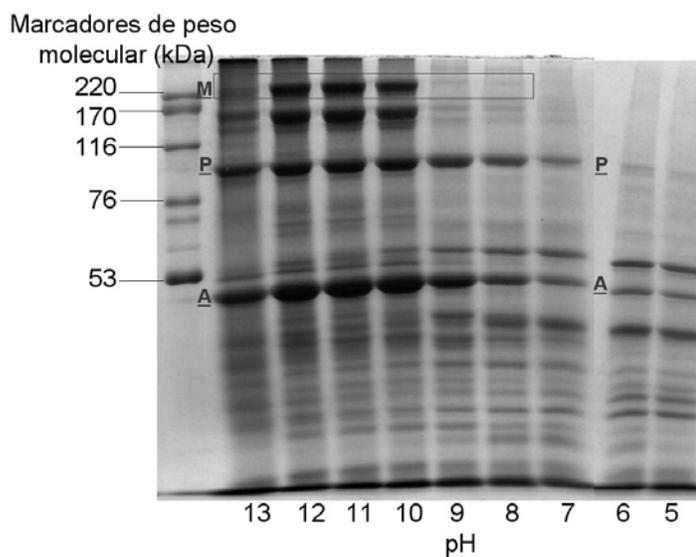


Figura 14. SDS-PAGE (10%) de proteínas de calamar solubles a diferentes valores de pH (después de centrifugar a 12000 g, 20 min). Los números en los carriles corresponden a los valores de pH. Se indican M = miosina, P = paramiosina, A = actina.

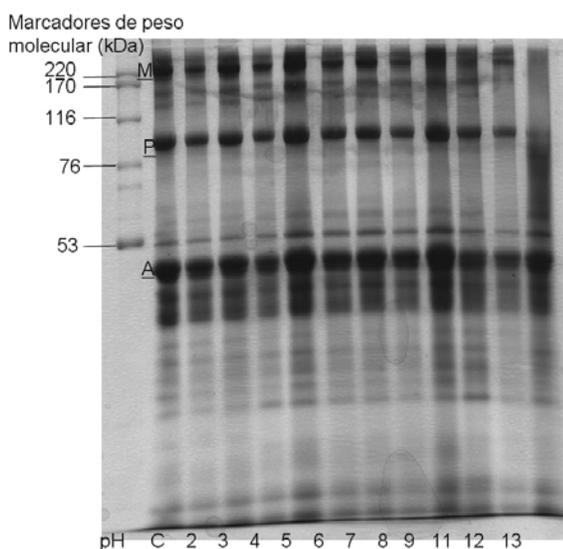


Figura 15. Proteínas afectadas a diferentes pH. Los números en los carriles indican pH, el carril marcado con C es el homogenizado inicial.

Actividad enzimática endógena.

La actividad proteolítica con azocaseína como sustrato, fue de 0.204, 0.315 y 0.317 mAU/g de manto, utilizando buffer de fosfatos, Tris-HCl y McIlvaine, respectivamente. En un reporte previo en el cual se evaluó la actividad proteolítica endógena del músculo de la misma especie de calamar, usando también buffer de fosfatos, se encontró una actividad enzimática similar (Ezquerro-Brauer, et al., 2002). A pesar de encontrarse diferencias entre la actividad de los extractos obtenidos con buffer de fosfatos fue mayor respecto a los obtenidos con las otras soluciones buffer, estos valores son bajos, y más aún considerando que las unidades están dadas por gramo de músculo.

Autohidrólisis de proteína de calamar

A las condiciones evaluadas, la autohidrólisis de calamar gigante fue mínima. Por electroforesis, en el conjunto total de proteínas no se distingue algún cambio durante el tiempo de reacción. Sin embargo, la electroforesis de las proteínas contenidas en la fracción sarcoplásmica mostró un cambio dentro de las primeras 2 h de reacción, seguido de un cambio gradual (Figura 16).

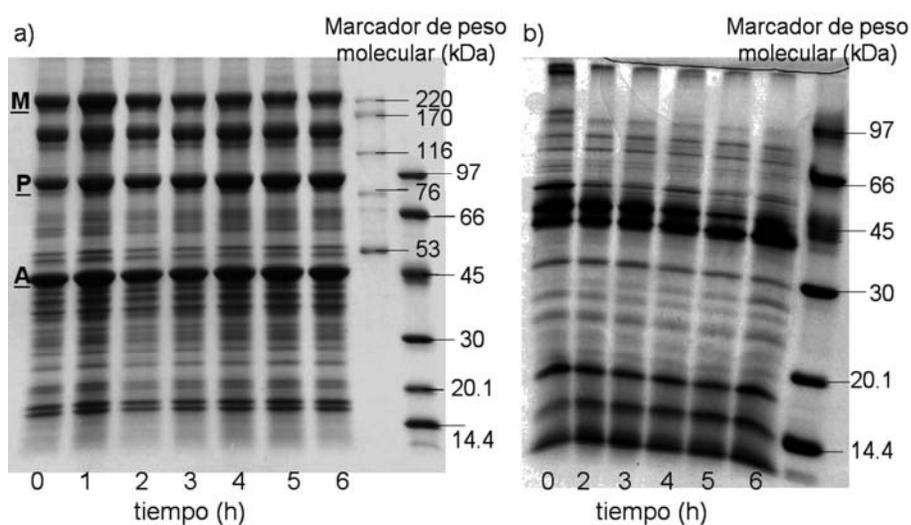


Figura 16. SDS-PAGE (7.5-15%) mostrando el efecto de autohidrólisis de proteínas de calamar a pH fisiológico, 6 h, 50 °C; (a) total de proteínas; (b) proteínas en sobrenadante. Los números indican el tiempo de incubación (h).

DISCUSIÓN

El manto de calamar es un recurso pesquero con un contenido de proteína similar al de algunas especies de peces (15 a 20% en base húmeda), con la ventaja de tener una baja concentración de lípidos. El manto completo contiene casi todos los aminoácidos e

incluye los esenciales, siendo el de mayor concentración glicina; dentro de la fracción soluble en agua las proporciones de los aminoácidos se reducen considerablemente. Adicionalmente, el contenido de prolina es muy bajo tanto en el músculo completo como en la fracción soluble en agua. Comparado con otras especies de calamar como *Todaropsis* sp (Ruiz-Capillas, et al., 2003), las proporciones son muy distintas, siendo el ácido glutámico el de mayor concentración, seguido del aspártico; y prolina significativamente mayor que para *D. gigas*.

En el gel de electroforesis (Fig. 10) se observan las principales proteínas reportadas para el músculo de calamar (Gómez-Guillén, et al., 2003, Konno, et al., 2003, Paredi and Crupkin, 1997). La banda de paramiosina es la correspondiente a los ~111 kDa más gruesa que la de la miosina, lo cual indica que es más abundante, o bien que se trata de dos proteínas de peso molecular aproximado. También se observa una banda de aproximadamente 150 kDa que podría ser es la cadena de la meromiosina pesada (Konno, et al., 2003). Aproximadamente a 17 kDa se observa una banda de proteína que podría corresponder a la troponina. La banda de proteína cercana a los 20 kDa podría pertenecer a las cadenas ligeras de la miosina. El resto de las bandas pudieran corresponder a la fracción sarcoplásmica.

Se ha reportado que la miosina de calamar es soluble en soluciones de fuerza iónica baja (Sikorski and Kolodziejaska, 1986) y como puede verse en el perfil electroforético de proteínas, a fuerzas iónicas bajas sí se observa una banda muy tenue de la miosina pero es despreciable en comparación con la contenida en la fracción no

soluble. Se observa también que aún después del proceso de extracción con fuerza iónica de 1, quedan proteínas miofibrilares no solubilizadas. En general, para procesos de separación de proteínas por solubilidad, como la reportada por (Hashimoto, et al., 1979), se recomienda una fuerza iónica baja (0.05) para solubilizar la fracción de proteínas sarcoplásmicas seguida de una extracción con soluciones de fuerza iónica media (0.5) para extracción de la fracción miofibrilar. Sin embargo, de acuerdo a los resultados aquí obtenidos, se sugiere una extracción de proteínas sarcoplásmicas con agua destilada y la fracción miofibrilar puede simplemente ser resuspendida con agua o solubilizadas utilizando soluciones de fuerza iónica de 0.6 en adelante.

En la curva de titulación de las proteínas de calamar (Figura 12) no fue posible encontrar el pH al cual la carga neta sea cero (un pseudo-punto isoelectrico), ni tampoco se observa un posible comportamiento amortiguador del total de proteínas; sin embargo, una aproximación del punto isoelectrico sí se distingue a través de la curva de solubilidad a cada punto de la escala de pH (Figura 13), en la cual se presenta un punto de menor solubilidad, que equivale al punto isoelectrico del total de proteínas en la mezcla. El conocimiento de esta curva de solubilidad, así como el tipo de proteínas que sean solubles a los diferentes valores de pH, mostrado en el perfil electroforético de la figura 14, permite sugerir las posibles aplicaciones de la proteína. Esto también es importante ya que se pueden aprovechar los cambios de solubilidad como efecto de pH para diferentes procesos de separación y recuperación de proteínas, o separación de algunas fracciones como la que proporciona el sabor ácido-amargo característico del

músculo de este organismo (Sánchez-Brambilia, et al., 2004). Por otro lado, es de particular interés que las proteínas no sufran algún daño por efecto de pH, sea debido a las condiciones de pH o porque se activara significativamente alguna enzima proteolítica. Al menos durante 1 hora de incubación a pH 2 a 12 no tienen un cambio notorio, pero sí a pH 13, en el cual el cambio es evidente por electroforesis (Figura 15).

Dentro del intervalo de unidades actividad por gramo de músculo para evaluación de la actividad enzimática con azocaseína como sustrato, se encuentra un valor similar al reportado por (Ezquerro-Brauer, et al., 2002) para condiciones similares. Sin embargo, esta actividad es el resultado de multiplicar valores de absorbancia <0.01 , lo cual es posible que se acerque al error del equipo. Por otro lado, bajo las condiciones evaluadas en este trabajo, la autohidrólisis es poco detectable. Por observación del perfil de proteínas a los diferentes tiempos de incubación, no es notorio un cambio en dichos perfiles. Sin embargo, las enzimas endógenas afectaron a la fracción sarcoplásmica (solubles en agua), y es un cambio que se detecta desde las 2 horas. Lo obtenido bajo el sistema presentado se repitió para diferentes condiciones de pH y temperatura. Lo cual será ventajoso para los hidrolizados, pues ya no habrá que “restar” el efecto autohidrólisis al de adición de enzima.

CAPITULO II: Cambios en las propiedades funcionales de las proteínas de calamar debidos al almacenamiento del manto

ANTECEDENTES

Dentro del manejo *post mortem* de cualquier organismo de interés comercial, además de contemplar la evaluación de frescura y del deterioro, se debe estudiar por un lado, cómo se afectará la estructura de sus tejidos musculares durante el almacenamiento y por el otro, si las propiedades funcionales serán adecuadas después de haber sido almacenado el músculo. Los estudios de evaluaciones *post mortem* de las diferentes especies de calamares no han sido suficientes, Se tiene un reporte de los cambios en los tejidos en calamar argentino (*Illex argentinus*) y se encontró que cuando el manto de calamar se almacena en congelación (-20°C) se presenta agregación entre las fibras musculares lo cual incrementa gradualmente con el tiempo de almacenamiento a dicha temperatura. Este cambio en las fibras musculares se vera reflejado en los atributos de textura, y cuando el músculo se congele por tiempo prolongado, la masticabilidad (relación entre la fuerza del músculo y su elasticidad) será mayor (Ueng and Chow, 1998). En otro estudio con *Loligo bleekert*, otra especie de calamar, durante la refrigeración (5°C) de su manto, se observó que la firmeza del músculo disminuye durante las primeras horas (3 a 9) de refrigeración. Las observaciones al microscopio mostraron poros entre las células musculares refrigeradas; aparentemente, debido a una separación de las células musculares de los tejidos musculares, los autores argumentan

que la causa fueron las proteasas endógenas, sin embargo, no lo demostraron (Ando, et al., 1999).

Los cambios bioquímicos posteriores a la muerte involucran la degradación de adenosin trifosfato (ATP), que por ausencia de oxígeno, ocasiona el desvío a la ruta de glicólisis anaerobia, a través de la cual se produce octopina. En la ruta de degradación del ATP (Figura 17), se producen adenosin difosfato (ADP), adenosin monofosfato (AMP), inosin monofosfato (IMP), inosina (Ino) e hipoxantina (Hx). Estos metabolitos son considerados para determinar la frescura de los alimentos de origen marino, relacionándolos a través del índice K, que es el cociente del producto de las concentraciones de compuestos no fosforilados entre el producto del total de metabolitos, según la ruta de degradación de ATP (Calvo-Hurtado, 2001).

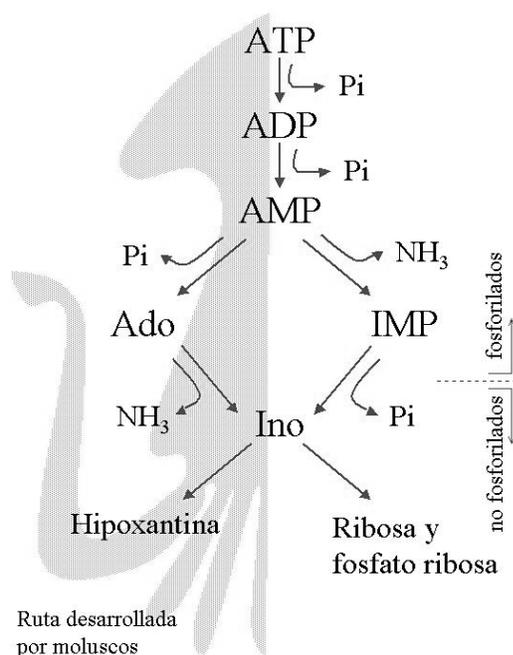


Figura 17 Ruta de degradación post-mortem de ATP

El valor del índice K se ha utilizado como indicador de frescura principalmente de vertebrados marinos ya que guarda una relación lineal con el tiempo de manejo post captura. Sin embargo, en moluscos la relación no es lineal. En *D. gigas* la degradación de ATP, y por tanto, el valor del índice K, se eleva exponencialmente a partir de la muerte (Calvo-Hurtado, 2001). Se ha recomendado el uso de otros parámetros para evaluar la frescura o en su caso el deterioro además del índice K. Uno de ellos es la evaluación de sustancias nitrogenadas originadas por la acción microbiana sobre el alimento; entre ellas se encuentran: amoniaco, mono, di y trimetilamina, y ácidos volátiles reductores. En el músculo de calamar se presenta un inconveniente con este otro parámetro, ya que durante la evaluación se cuantifica al cloruro de amonio, presente de manera natural en el músculo de calamar. Por lo que ha sido necesaria la búsqueda de otros criterios para la evaluación de la frescura del músculo de calamar. Por ejemplo, en estudios con calamar común japonés, se encontró que el índice K podría ser indicador de frescura al principio del almacenamiento, al igual que la concentración de arginina u octopina. En etapas posteriores no es apropiado, y se sugiere la relación Hx/AMP como el mejor indicador de frescura (Ohashi, et al., 1991). Sin embargo, aún es necesaria mayor investigación y desarrollar el vínculo entre el conocimiento que se genere con las investigaciones y la normatividad que regula los criterios de frescura.

En investigaciones previas con calamar gigante y otras especies de calamares, se ha reportado la disminución en los atributos de textura del músculo durante almacenamiento, así como una baja funcionalidad de las proteínas de calamar gigante cuando es procesado; específicamente se refiere a la capacidad de formar geles térmicos. Se ha publicado que la causa de la baja funcionalidad y pérdida de textura se debe a la

alta actividad enzimática endógena presente en el músculo de calamar (Ayensa, et al., 2002, Gómez-Guillén, et al., 2002, Gómez-Guillén, et al., 2003). En otro tipo de estudios se ha demostrado que el almacenamiento en congelación afecta a las propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares, especialmente a la miosina, debido a lo llamado desnaturalización-agregación (Paredi and Crupkin, 1997). Sin embargo, en los reportes no se especifica las condiciones del manejo *post mortem* ni se mencionan otras propiedades funcionales estudiadas además de la gelificación.

Los objetivos de este capítulo fueron evaluar los cambios en el arreglo de las fibras musculares del manto de calamar ocurridos durante el almacenamiento en hielo y en congelación, así como el efecto de almacenamiento en hielo de pasta de calamar sobre las propiedades funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestra

Los individuos fueron capturados de la forma mencionada en “Materiales y Métodos Generales”. Los individuos (n=10) que se utilizaron para análisis de histología; fueron procesados en la lancha para toma de muestra de organismos al momento de la muerte (tiempo cero), como se indicará en párrafos posteriores.

Efecto de almacenamiento en hielo sobre la capacidad de formar gel

Se tomaron pequeñas piezas de varios mantos y aleta (con piel) de diferentes individuos, estos trozos se colocaron en una licuadora y se disgregaron a máxima velocidad hasta formar una pasta lo más homogénea posible. Esta pasta se guardó en porciones de 400 g dentro de bolsas de plástico acomodadas entre camas de hielo para mantener una temperatura promedio de 0°C, bajo estas condiciones se almacenó la pasta durante 16 días para evaluar el efecto de almacenamiento sobre la capacidad de formar gel. A los días 0, 2, 4, 6, 9, 12 y 16 se tomaron alícuotas de la pasta, y se prepararon geles térmicos de la forma descrita en materiales y métodos generales. A los geles térmicos obtenidos a partir de la pasta de calamar almacenada por diferentes períodos, se les realizó la prueba de doblado y el APT, utilizando cuatro réplicas en cada día de muestreo.

Efecto de almacenamiento en hielo sobre las propiedades funcionales y las fracciones de la pasta de calamar

Se agruparon pequeñas piezas de varios mantos (sin piel) de diferentes individuos (tres réplicas de 3 ó 4 organismos), estos trozos se colocaron en una licuadora y se disgregaron a máxima velocidad hasta formar una pasta lo más homogénea posible para cada grupo. Cada pasta se guardó en bolsas de plástico y se almacenó acomodada entre camas de hielo para mantener una temperatura promedio de 0°C. Se tomaron muestras a 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 16 días para evaluar el efecto de almacenar la pasta de calamar a 0°C sobre el perfil de proteínas en SDS-PAGE, y sus propiedades funcionales

de solubilidad, formación de espuma, formación de emulsión y estabilidad de las mismas, todas ellas descritas en métodos generales, cada ensayo se realizó por triplicado para cada grupo.

Se obtuvieron las fracciones de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas utilizando el procedimiento descrito en métodos generales, así como los cambios en el perfil de proteínas que fueron analizadas por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras SDS-PAGE (10%), esta metodología se describe descrita en métodos generales (Laemmli, 1970).

Efecto de almacenamiento de manto de calamar sobre las fibras musculares

Al tiempo cero (momento de la muerte) se cortaron muestras (1×1×1 cm) de la zona ventral del manto de diez calamares y se procesaron como se describe más adelante. En el laboratorio, el resto de los mantos de los organismos muestreados para análisis histológico, fueron cortados en dos partes iguales y colocados individualmente en bolsas de plástico; una mitad se almacenó a 0°C y la otra a -20°C. Después de 7 días de almacenamiento, se cortaron muestras de 1×1×1-cm para examinar al microscopio las tres secciones X (longitudinal), Y (lateral), and Z (transversal).

Las muestras correspondientes a cada condición se colocaron en cajas de histología y fueron procesadas de acuerdo a la metodología de (Howard and Smith, 1983); en la cual, las muestras son deshidratadas por inmersión en solución de Davidson durante 48 hr, luego fueron cambiadas sucesivamente a soluciones ascendentes de 70 a

100% de etanol con incrementos de 10%. Después de 1 h en cada solución de etanol, los cubos se lavaron con una solución de etanol-xilol (1:1), seguido de un lavado con xilol 100%. Después fueron embebidos en parafina y por medio de un microtomo se obtuvieron cortes seccionales de 4 μm , los cuales fueron teñidos con la solución de hematoxilina de Mayer (Howard and Smith, 1983). Fueron observados y digitalizados con un sistema de análisis de imagen, el cual consistió en un Microscopio de Luz con campo claro y contraste de fases (Olympus BX50), una cámara digital CoolSNAP™ y el paquete Image pro Plus 5.4.29

RESULTADOS

Al inicio del almacenamiento, las diferentes fracciones fueron 84.85% de proteínas miofibrilares, 9.61% de sarcoplásmicas, 2.62% de proteínas estromales, y 2.96% de compuestos nitrogenados no proteicos. Los valores de las fracciones cambiaron significativamente ($P \leq 0.05$) durante el almacenamiento a 0°C (Figura 18).

El análisis por SDS-PAGE del total de proteínas del calamar muestra la presencia de la cadena pesada de miosina, actina y paramiosina. No se observa degradación de las proteínas durante el almacenamiento a 0°C durante 16 días (Figura 19). Sin embargo, durante la extracción de las proteínas miofibrilares, la cadena pesada de miosina no se observa por electroforesis (Figura 20), mientras que la paramiosina y a actina permanecen presentes y sin aparente degradación.

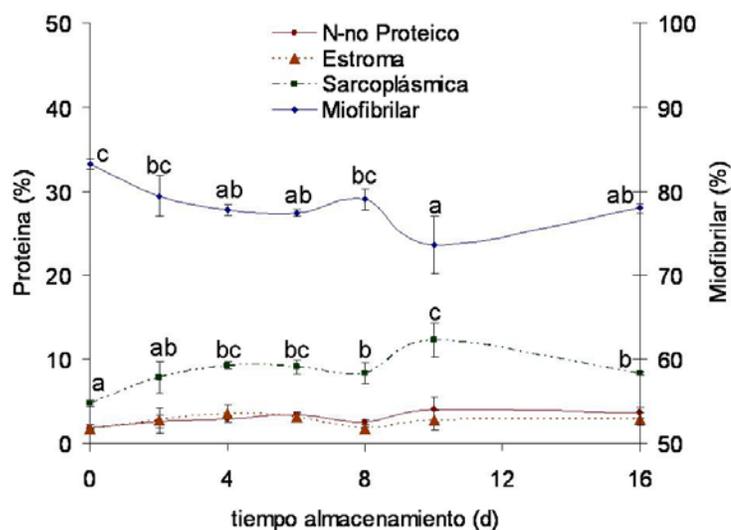


Figura 18. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C en las fracciones de proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas, estromales y compuestos nitrogenados no proteicos (NNP). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

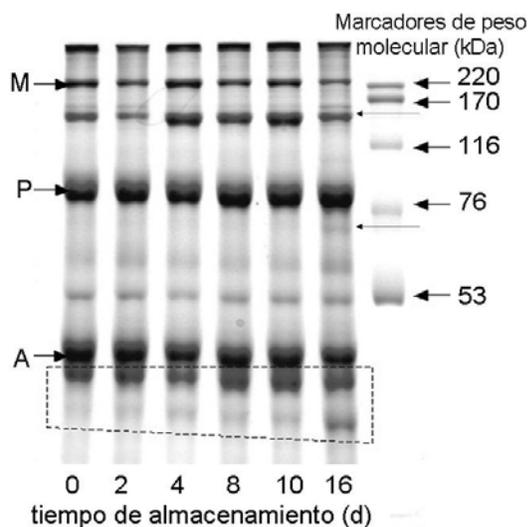


Figura 19. Efecto del almacenamiento en el perfil de proteínas de calamar. Los números en los carriles corresponden al tiempo de almacenamiento. Se indican la miosina (M), paramiosina (P) y la actina (A). En el recuadro de línea punteada se indican las proteínas que cambiaron durante el almacenamiento.

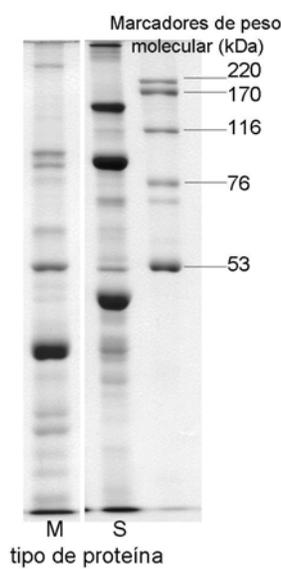


Figura 20. Fracciones de proteínas miofibrilares (M) y sarcoplásmicas (S) de manto de calamar.

Capacidad de formar geles

Por medio de la escala de Suzuki (1981 en Ayensa, 2002) se encontró que los geles obtenidos de calamar homogenizado tuvieron la máxima calidad de doblado, lo cual fue válido para pastas almacenadas a 0°C durante 0 a 12 días. A los 16 días de almacenamiento, el gel se rompió gradualmente al primer doblado, teniendo 3 como “calificación”. Los atributos de textura evaluados por el ATP no se vieron afectados significativamente ($P \leq 0.05$) por el almacenamiento durante los 16 días. En este experimento, 75% de la compresión de gel fue suficiente para producir fractura, la cual se obtuvo en promedio aplicando 52.97 ± 1.28 N. Los máximos valores de dureza, cohesividad y elasticidad fueron 65.07N, 365.6% y 68.14%, respectivamente (Figura 21).

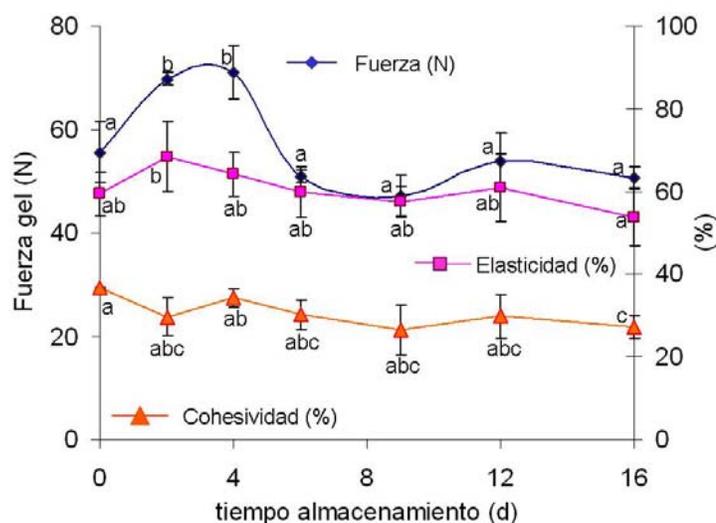


Figura 21 Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C sobre los atributos de textura de gel de calamar homogenizado. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Propiedades funcionales

Durante el almacenamiento a 0°C del calamar homogenizado, la solubilidad de las proteínas fue afectada significativamente, incrementando en más de 40% (Figura 22). Los cambios en la solubilidad pueden reflejar algunos procesos ocurridos durante el almacenamiento, que involucren interacciones entre proteínas y proteína-agua, que incrementen la proteína extraída con agua (fracción sarcoplásmica) resultando en una disminución de la fracción miofibrilar.

La formación de espuma varió significativamente ($P \leq 0.05$) durante el almacenamiento, aumentando de 81 a 162% (Figura 23). La máxima estabilidad de espuma fue de 94% para el día 16. La capacidad de emulsión también cambió significativamente ($P \leq 0.05$) durante los 16 días de almacenamiento a 0°C,

incrementando de 23 a 33%; los valores de estabilidad de emulsión también incrementaron, de 59 a 88% (Figura 24).

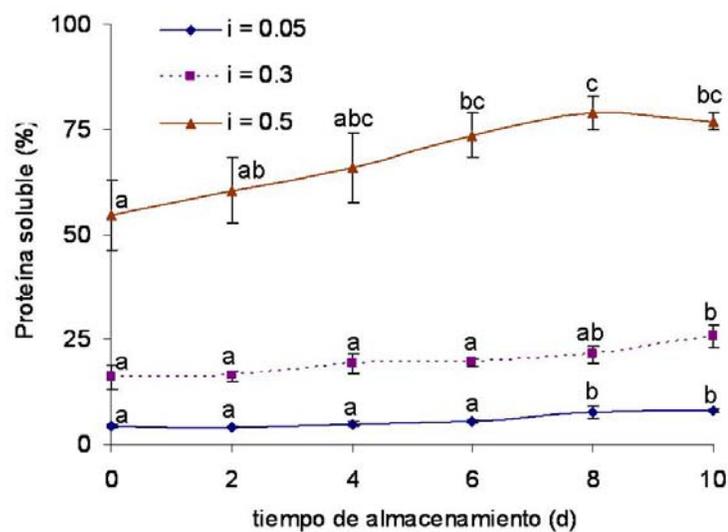


Figura 22. Efecto del tiempo de almacenamiento a 0°C, sobre la solubilidad de proteína de calamar. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

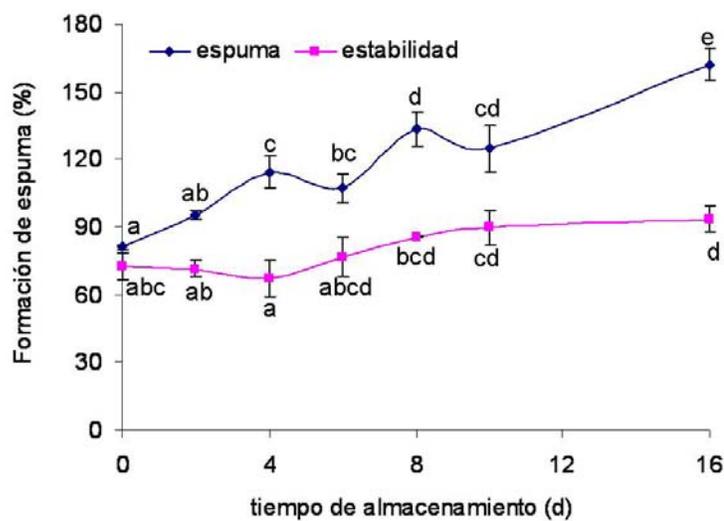


Figura 23. Efecto de almacenamiento a 0°C sobre la capacidad de formar espuma (W) y sus estabilidad (S). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

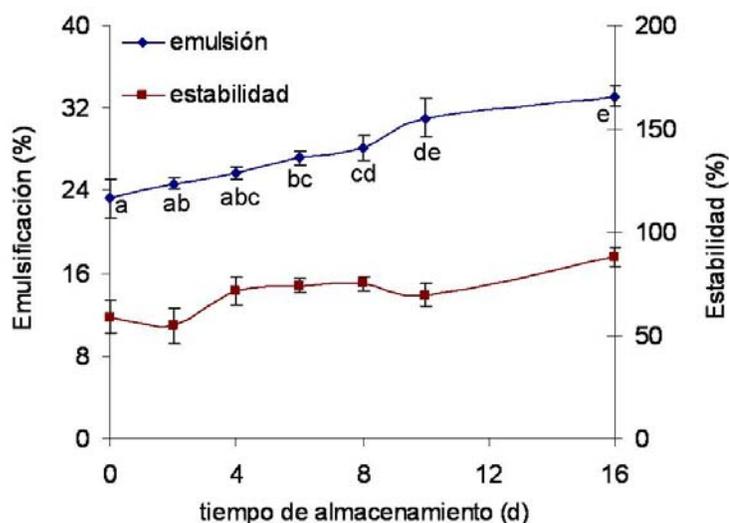


Figura 24. Efecto de almacenamiento a 0°C sobre la capacidad de formar emulsión (E) y su estabilidad (S). Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Arreglo de fibras musculares

El análisis por histología mostró que el músculo de calamar al momento de la muerte tiene un arreglo de fibras de una forma continua y homogénea (Figura 25a); después de ser almacenado a 0 °C, se presenta separación de las fibras musculares (Fig. 25b) con una posible ruptura de las mismas. El arreglo de fibras musculares después de almacenarse en congelación presenta una agregación de fibras musculares (Fig. 25c), que dan como resultado una estructura de espacios libres de fibras y de forma elíptica. Los valores promedio del área cubierta con fibras musculares longitudinales y radiales no fueron significativamente diferentes ($P < 0.05$), mientras que las fibras circunferenciales sí mostraron cambios bajo las diferentes condiciones de almacenamiento (Tabla II).

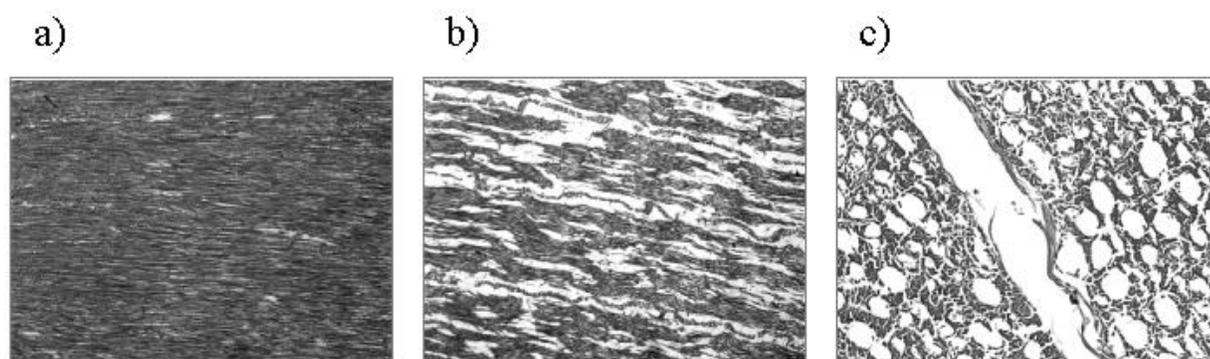


Figura 25 Efecto del almacenamiento sobre las fibras musculares de calamar (a) recién capturado; (b) después de 7 días a 0°C; (c) después de 30 días a -20°C

Tabla II. Efecto del almacenamiento en hielo sobre el área cubierta por fibras musculares. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$)

Condición	Fibra	Fibra Área (%)
Recién muerto (~1 h)	Longitudinal	72.31 ± 8.61 (a)
	Radial	68.02 ± 10.11 (a)
	Circunferencial	55.39 ± 14.81 (b)
Almacenado en hielo	Longitudinal	71.50 ± 9.45 (a)
	Radial	70.09 ± 6.57 (a)
	Circunferencial	60.32 ± 13.59 (b)
Almacenado a -20 C	Longitudinal	62.55 ± 11.49 (a)
	Radial	62.83 ± 13.69 (a)
	Circunferencial	56.09 ± 11.14 (b)

DISCUSIÓN

A pesar de que hubo cambios en las fracciones de proteínas, las propiedades funcionales de la proteína derivada de calamar permanecen útiles para estas puedan ser usadas como ingrediente alimentario. La solubilidad es una de las más importantes en los sistemas alimentarios, en este caso, se alcanzó un valor $>75\%$ con fuerza iónica de 0.5, en la cual se sabe se solubilizan la mayoría de las proteínas miofibrilares.

Otra propiedad funcional recurrida en ciencia y tecnología de alimentos es la capacidad de formar geles térmicos. Aquí se demuestra que las proteínas contenidas en el músculo del calamar tienen alta capacidad de formar geles. Los geles obtenidos a partir de calamar gigante recién capturado presentaron la mayor calidad (5 o AA) en la prueba de doblado, y altos valores de los parámetros del APT; mientras que otros autores reportan baja formación de gel y calidad menor a 2 en la prueba de doblado (Gómez-Guillén, et al., 1997). Además, esta propiedad no cambió significativamente durante el almacenamiento (a 0°C , durante 12 días). Al comparar los resultados aquí obtenidos con los reportados, se observa que para este estudio se usó calamar recién capturado, limpio y empacado entre camas de hielo, lo que permitió que la proteína del manto conservara las propiedades funcionales. Una posible explicación podría ser que en los reportes previos utilizan calamar congelado, sin conocimiento de las condiciones de manejo previo. La segunda explicación es por la presencia de aleta y piel para la elaboración de geles, lo cual probablemente benefició el proceso por la presencia de mayor cantidad de colágeno que pudo actuar como un soporte para la agregación de proteína. Finalmente, la gelificación probablemente mejoró por un cambio térmico rápido (del baño de hielo al

baño de 90°C), mientras que otros autores mencionan un incremento gradual de la temperatura. En pruebas posteriores se evaluó la capacidad de formar geles a partir de calamar congelado con y sin aleta, encontrando que la congelación y la inclusión de aleta y piel de ésta última, favorecen una mayor fuerza del gel (Figura 26).

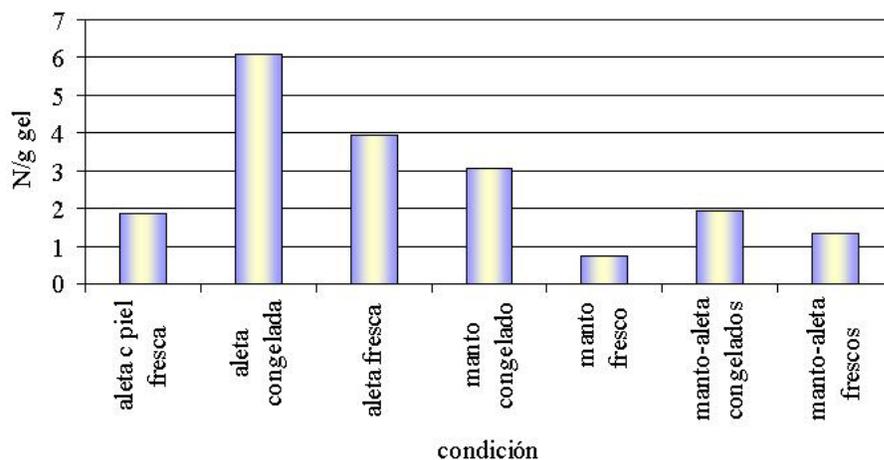


Figura 26. Fuerza de gel bajo diferentes condiciones y tejidos del calamar.

El incremento en la fracción sarcoplásmica está asociado a la disminución de la fracción miofibrilar, lo que sugiere alguna alteración durante el almacenamiento y/o proceso de extracción. Esto puede estar relacionado con los cambios en la solubilidad de proteínas. Los resultados en electroforesis sugieren un cambio mínimo en el total de proteínas, particularmente en las bandas de cadenas <53 kDa. Sin embargo, durante el proceso de extracción la miosina no se obtiene, sugiriendo que las bandas de 111 (ligeramente arriba de la paramiosina) y 150 kDa sean resultado de su hidrólisis, lo mismo que la de ~76 kDa. Ya se ha reportado que la miosina es una proteína poco estable comparada con otras miofibrilares como la paramiosina y la actina (Konno, et

al., 2003); por lo que el proceso de extracción deberá mejorarse para evitar la pérdida de la miosina.

La formación de espuma y su estabilidad incrementó durante el almacenamiento, sugiriendo que los cambios de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas durante el procesamiento, mejoraron esta propiedad funcional. El valor mayor de formación de espuma (162%) es menor que el de albumina de huevo (240% capacidad de formar espuma, 24% estabilidad); sin embargo, la estabilidad de la espuma formada con proteínas de calamar es de 3 a 4 veces mayor que el de la albumina (Bickerstaff, 2005). Estos resultados son alentadores para continuar la investigación con las proteínas de calamar como aditivos en alimentos en sistemas aireados. A pesar de que la capacidad de formar emulsión mostró una leve tendencia a incrementar, su valor nunca excedió el 40%.

Durante el almacenamiento en refrigeración y en congelación, todas las proteínas son susceptibles de sufrir algunos cambios estructurales que ocasionan interacciones proteína-proteína, dando como resultado la agregación de las mismas. Existen reportes con miosina de pescado, la principal proteína miofibrilar responsable de la capacidad de formar geles, que parcialmente se desdobra en músculo congelado-descongelado, con lo cual quedan expuestos residuos hidrofóbicos, promoviendo interacciones y así la agregación (Foucat, et al., 2001, Ramírez, et al., 2000). Estos cambios estructurales afectan el patrón de fibras musculares; en el manto refrigerado, se observó un comportamiento similar a lo visto en *Loligo bleekert* (Ando, et al., 1999), en el cual se demostró la separación de fibras musculares; con la hipótesis de ser resultado de

actividad enzimática endógena. Ya que en este trabajo, la actividad enzimática determinada con azocaseína resultó baja, la separación de las fibras en el músculo de *D. gigas* puede ser resultado de la presencia de otra enzima. Una colagenasa podría ser la responsable del cambio en las fibras (Konno, et al., 2003, Miura-Yokota, et al., 2004). Sin embargo, el análisis histológico no mostró daño del tejido conectivo del manto en refrigeración. Esto lleva a sugerir que la separación de las fibras sea un resultado de las interacciones proteína-proteína y proteína-agua ocurridas durante la refrigeración.

En los mantos congelados, se obtienen resultados similares a los reportados por (Ueng and Chow, 1998) para *Loligo edulis*, en el cual se da agregación de proteínas debido al cambio de temperatura. En este estudio, la agregación de las fibras musculares originó la formación de espacios de forma elíptica, lo anterior también pudo deberse a gotas de agua formadas durante el tiempo de congelamiento. Para músculo de pescado, los cambios en los patrones de las fibras durante el almacenamiento en congelación se han relacionado con los cambios conformacionales músculo-proteína, modificaciones en la interacción proteína-agua y a la movilidad del agua muscular (Herrero, et al., 2005). El rompimiento y separación de fibras musculares parece ser la principal razón del cambio de textura del manto de calamar gigante durante el almacenamiento en refrigeración (se reblandece) o en congelación (se endurece); y debe ser considerado en el manejo post-mortem. Con los resultados obtenidos en este capítulo se demuestra que la actividad proteolítica endógena es baja y que no influye de manera significativa en los cambios de atributos de textura y de las propiedades funcionales.

CAPITULO III: Efecto de procesamiento en las propiedades funcionales de las proteínas del manto de calamar

ANTECEDENTES

Ya se mencionó que un proceso de hidrólisis podría ser el adecuado para recuperar y aprovechar la proteína del músculo de calamar. La hidrólisis de proteínas de origen marino se ha mencionado en diferentes artículos y patentes, y se sabe que pueden mejorar las propiedades funcionales de las proteínas (Clemente, 2002, Diniz and Martin, 1997, Gildberg, 1993). Además, los hidrolizados de proteína poseen características con valor biológico como: el hecho de contener péptidos promotores de crecimiento; antioxidantes; alergénicos; antibióticos, anticancerígenos, y atractantes, entre otros (Córdova-Murueta and García-Carreño, 2002, Dziuba, et al., 1999, Peña-Ramos and Xiong, 2001). Las propiedades y futuros usos de los hidrolizados, dependen de la enzima que se utilice, el grado de hidrólisis y las condiciones en las que se desarrolle la reacción (pH, temperatura) (Dzwolak and Ziajka, 1999).

En el caso de las proteínas de origen marino, las enzimas alcalinas de origen microbiano, como la alcalasa, han mostrado ser más efectivas para obtener hidrolizados con propiedades funcionales deseables. También, las de origen vegetal, se han utilizado en general para proporcionar a los hidrolizados propiedades organolépticas deseables (Gildberg, 1993). De las enzimas vegetales, la bromelaína y papaína ya han sido utilizadas para marinar y suavizar el manto de calamar (Venugopal, et al., 2000). La papaína, por su parte, se ha utilizado para obtener péptidos relativamente grandes. Con

base en lo anterior, además de ser consideradas generalmente recomendadas como seguras “GRAS”, la alcalasa y la papaína fueron las enzimas seleccionadas para este trabajo.

Con un cuidadoso control de la hidrólisis enzimática es posible modificar adecuadamente las propiedades funcionales de las proteínas de origen marino. El grado de hidrólisis es importante para optimizar los parámetros de proceso, y obtener un producto con propiedades funcionales requeridas. Una reacción de hidrólisis prolongada, o sin control, daría origen a péptidos solubles tan pequeños que carecerían de funcionalidad.

Hay diversos factores, como las condiciones de proceso o de almacenamiento de la fuente de proteína, que afectan a las proteínas y pueden modificar sus propiedades funcionales, adicionalmente, si se encuentran dentro de un sistema alimentario, podrían afectar negativamente las propiedades de los alimentos (Hall, 1996); (Adler-Nissen, et al., 1983, Damodaran, 1996). El procesamiento de la materia prima para obtener un producto comercial puede alterar el estado nativo de las proteínas. Algunos ejemplos de las variables de los procesos son el pH y la temperatura (Hall, 1996). La interacción con otros componentes, y los tratamientos mecánicos son parámetros que influyen sobre las propiedades funcionales de las proteínas, especialmente el de solubilidad (Vojdani, 1996).

Para proponer un proceso adecuado para la industrialización del músculo de *D. gigas*, es necesario evaluar el cambio de las propiedades funcionales promovido por

condiciones tales como temperatura y pH. Estudios similares se han realizado con vertebrados marinos, por ejemplo con salmón, se encontró que al aumentar o disminuir el pH se mejora la capacidad de formar emulsión, lo cual está relacionado con un incremento en la hidrofobicidad de superficie, así como las interacciones entre las proteínas y el medio (Hammershoj, et al., 2006, Kristinsson and Hultin, 2003). En otros estudios se encontró que al aumentar la temperatura, y el tiempo de exposición a ésta, aumenta también la hidrofobicidad de superficie así como la formación de enlaces disulfuros con lo cual, se mejoraba la capacidad de formar emulsión (Hammershoj, et al., 2006). Otros reportes, muestran un resultado opuesto, y demostraron que a altas temperaturas aumenta también la hidrofobicidad lo cual conduce a la desnaturalización y agregación de proteínas que a su vez lleva a la disminución de propiedades funcionales, principalmente la de solubilidad (Poulter, et al., 1985, Tornberg, 2005).

Los objetivos de este capítulo fueron evaluar el efecto del pH y temperatura sobre las propiedades funcionales de la proteína de calamar y evaluar el efecto combinado de ambas variables de proceso en las propiedades funcionales de hidrolizados de proteína de calamar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras

Para este capítulo se utilizaron los mantos que fueron capturados y procesados como se describió en métodos generales y que fueron almacenados en congelación (a -

20°C). Para usarlos, se cortaron trozos de diferentes mantos y fueron descongelados sobre una charola con hielo dentro de un refrigerador 2-4°C aproximadamente por 8 horas; una vez descongelados se removieron las capas interna y externa de tejido conectivo que cubren el manto, y los trozos fueron cortados en piezas pequeñas, en seguida se colocaron en una licuadora y se disgregaron durante 30 s a máxima velocidad para obtener una pasta homogénea. Durante la preparación, se mantuvo una temperatura de 2-4 °C.

Efecto de la temperatura de proceso sobre las propiedades funcionales.

Se preparó homogenizado de calamar utilizando agua destilada de la misma forma descrita en métodos generales hasta una concentración final de 3% proteína, se mantuvo en un sistema con agitación continua y a diferentes temperaturas controladas (0, 10, 20, 30, 40 y 50°C) manteniendo pH constante en 5.9 (natural). Se incubaron durante 1 h, posteriormente se evaluaron las propiedades funcionales de solubilidad, formación de espuma y emulsión.

Efecto del pH de proceso sobre las propiedades funcionales.

La siguiente etapa consistió en preparar otro homogenizado de calamar de manera similar al anterior, este homogenizado se mantuvo en incubación en un sistema con agitación continua manteniendo temperatura controlada (3°C), y a diferentes pH (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13). Se incubaron durante 1 h, posteriormente se evaluaron

las propiedades funcionales de solubilidad, formación de espuma y de emulsión, así como el perfil de proteínas por electroforesis.

Producción de hidrolizados

Se preparó homogenizado de calamar-agua destilada (3% proteína), se tomaron 90 ml de este homogenizado y se colocaron en un vaso de precipitados de 100 ml. Para hidrolizar la proteína. La hidrólisis se desarrolló utilizando el método de pH-Stat (718 Stat Trtrtrino, Metrohm) en condiciones controladas de temperatura, pH y velocidad de agitación constantes. Las enzimas comerciales Alcalasa (Novo) y papaína (Sigma) fueron utilizadas. En un ensayo preliminar a pH 8 y a 50°C se buscó la relación enzima/sustrato (E/S) necesaria para lograr un grado de hidrólisis (DH%) de 3% en 60 min a esas condiciones, encontrando los valores de 3 y 0.3 unidades de actividad por gramo de proteína (sustrato) (AU/gP) para alcalasa y papaína respectivamente. Una Unidad de Actividad (U) se define como el cambio en absorbancia a 366 nm por minuto, por mg de proteína (azocaseína) en la mezcla de reacción (Navarrete Del Toro and García-Carreño, 2002).

Los valores mencionados de 0.3 y 0.03 UA para alcalasa y papaína respectivamente, fueron los mismos que se usaron para los ensayos siguientes en los que se obtuvieron hidrolizados bajo diferentes condiciones de temperatura (30, 35 y 40 °C) y pH (8, 9 y 10).

Después de 60 min de reacción de hidrólisis, se evaluaron las propiedades funcionales (solubilidad, capacidad formación de espuma y emulsión) de los hidrolizados obtenidos a cada una de las condiciones utilizadas. El grado de hidrólisis (DH%) se determinó de acuerdo al método descrito por (Adler-Nissen, 1986).

RESULTADOS

Efecto de la temperatura sobre las propiedades funcionales.

En la figura 27 se muestra el efecto de la temperatura de incubación del homogenizado de calamar sobre las propiedades funcionales.

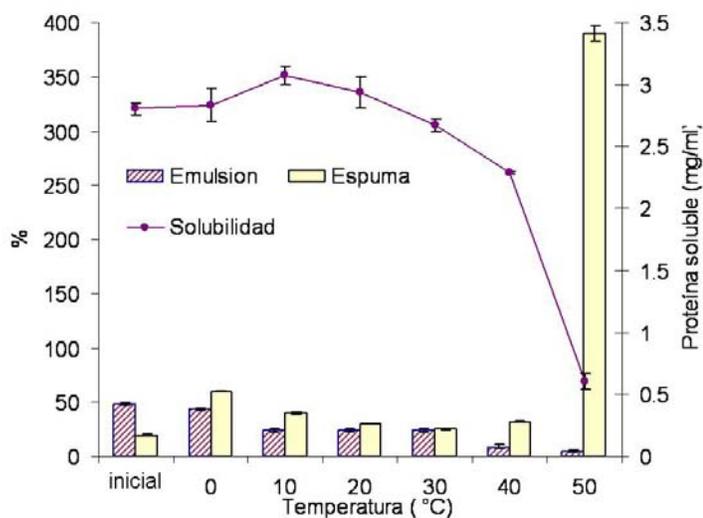


Figura 27. Efecto de la temperatura sobre las propiedades funcionales.

Efecto del pH sobre las propiedades funcionales

El punto isoeléctrico (pI) global se obtiene a pH 5, el cual se desplaza hacia 4 y 3 con el cambio de fuerza iónica de 0.3 a 0.5, respectivamente. A pH 12-13 la solubilidad es mayor a fuerza iónica de 0.5, mientras que en la región de pH 2-4 es mayor la solubilidad en solución de baja fuerza iónica (0.05) como se muestra en la figura 28.

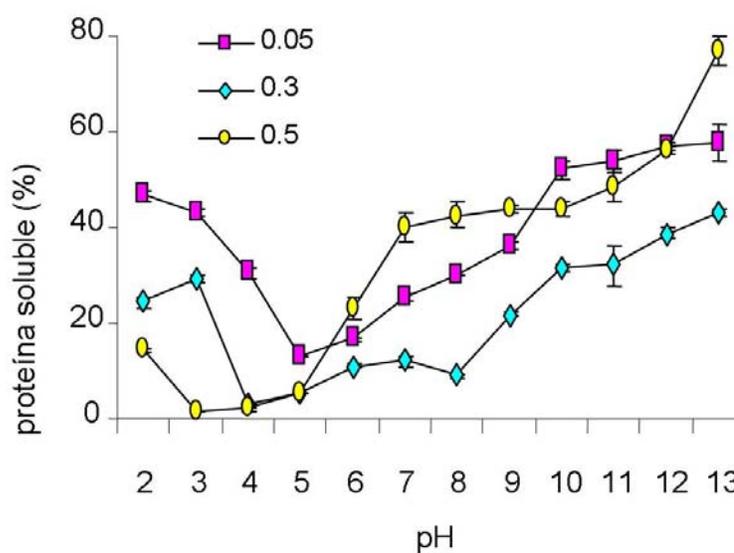


Figura 28. Efecto del pH en la solubilidad de proteínas de calamar a diferentes fuerzas iónicas.

La formación de espuma tiene un comportamiento similar al de solubilidad, pero con el menor valor a pH 7. Es importante resaltar que aunque los valores de capacidad de formar espuma son mayores a pH 12, la estabilidad es de 100% a pH 8 y 9 (Figura

29). El valor mayor de la formación de emulsión es a pH 9 (Figura 30), en el cual se obtienen una emulsión compacta y con consistencia similar a una mantequilla. El punto en el que no se produce emulsión es a pH 5, punto que coincide con el pI del total de proteínas.

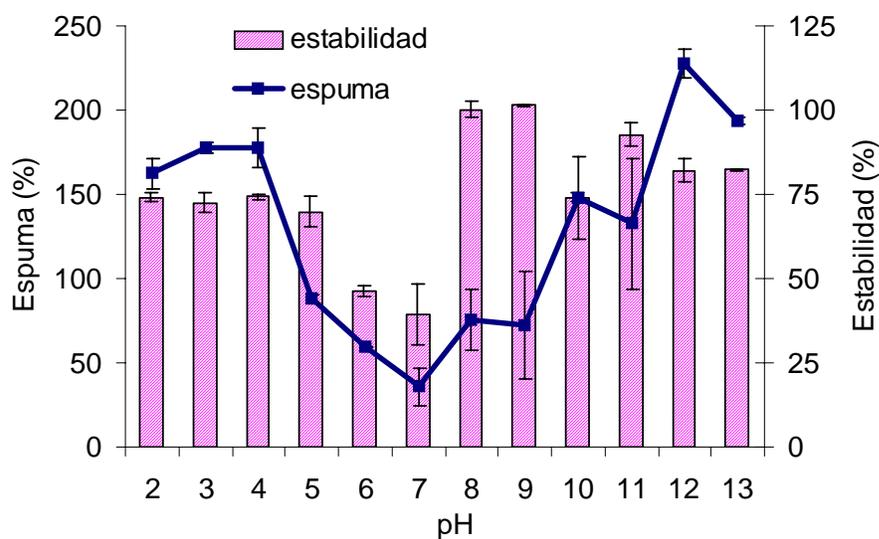


Figura 29. Efecto del pH sobre la capacidad de formar espuma de las proteínas de calamar, en barras se muestra la estabilidad de la espuma.

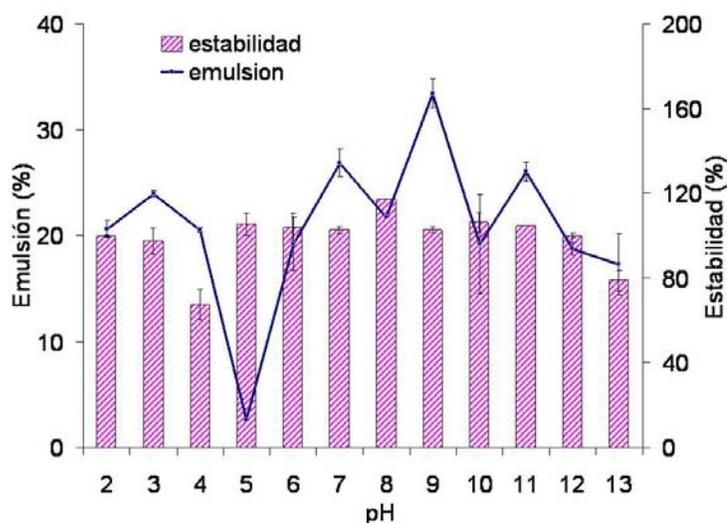


Figura 30. Efecto del pH sobre la capacidad de formar emulsión de la proteína de calamar, en barras se muestra la estabilidad después de un tratamiento térmico.

Hidrólisis enzimática de proteína de calamar

En el ensayo preliminar a pH 8, 50 °C, con un %DH de 3%, la miosina es totalmente hidrolizada por las dos enzimas evaluadas (Figura 31). La paramiosina y la actina no son hidrolizadas totalmente por la papaína, y aún menos por la Alcalasa. Los péptidos producidos por Alcalasa se pueden agrupar en tres zonas de tamaño: 66-97, 40-45 y 19-20 kDa. Con papaína se obtienen péptidos se distribuyen entre los 18 y 97 kDa. Se eligió un grado de hidrólisis de 3%, que permitiera que las proteínas solubilizaran y mejorando o al menos sin que perdieran sus propiedades funcionales. Este valor se obtuvo adicionando 0.3, 0.03 U g⁻¹ de proteína, de Alcalasa y papaína, respectivamente; lo que en este caso fue equivalente a 80 µl de Alcalasa, y 273 µl de papaína, adicionados por litro de homogenizado (3% proteína). Para estas condiciones de reacción, los

hidrolizados presentaron los valores de propiedades funcionales mostrados en la tabla III.

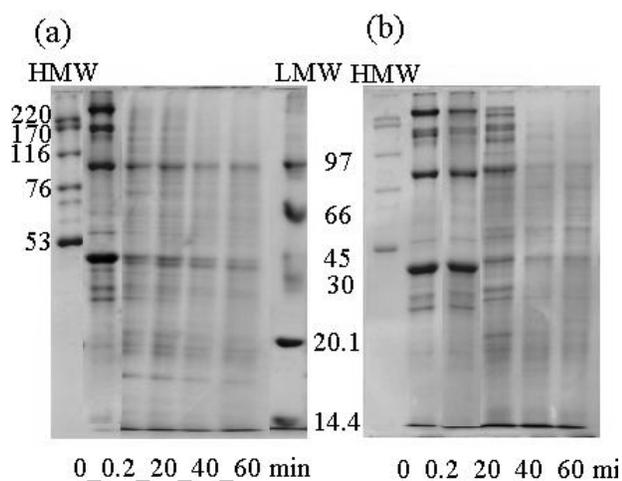


Figura 31. SDS-PAGE (10%) de la hidrólisis de proteínas de calamar, DH 3%. (a) Alcalasa y (b) papaína. HMW y LMW marcadores de alto y bajo peso molecular. Los números en los carriles indican el tiempo de reacción (min).

La composición de aminoácidos en la fracción proteica soluble no varió significativamente entre los hidrolizados obtenidos a 50°C; sin embargo, entre los hidrolizados y la proteína sin tratamiento sí hay un cambio en la concentración de algunos aminoácidos. Esta concentración de aminoácidos únicamente se refiere a la composición de la fracción soluble. Como se muestra en la figura 32, los aminoácidos esenciales para el humano recomendados por la FAO (FAO/WHO/UNU, 1985), se encuentran contenidos en la proteína de calamar con y sin hidrólisis.

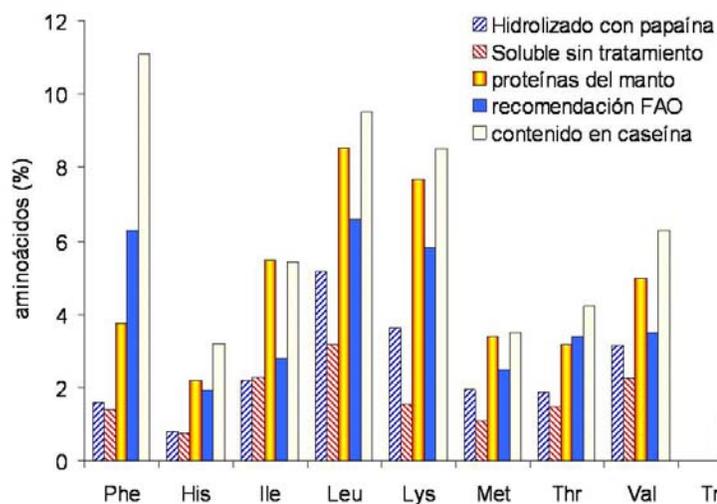


Figura 32. Aminoácidos esenciales de proteína de calamar entera, soluble en agua e hidrolizada, se compara con recomendación de la FAO y con caseína.

Efecto de las condiciones de hidrólisis sobre las propiedades funcionales.

El efecto combinado de pH y temperatura en la reacción de hidrólisis afectó de manera diferente a las propiedades funcionales que el que cada variable afectó a las proteínas sin hidrolizar. La capacidad de formar espuma es mayor para los hidrolizados obtenidos con papaína que para los obtenidos con alcalasa, en cualquiera de las condiciones evaluadas, obteniéndose un valor máximo de $245 \pm 17.68\%$ para la hidrólisis con papaína a pH 8 y 25°C . La mayor capacidad de formar emulsión fue de 32% y la presentaron los hidrolizados con alcalasa a pH 8 y 35°C . Un valor cercano a 80% de recuperación de proteína se obtuvo mediante la hidrólisis con papaína a pH 10 y bajo las tres temperaturas evaluadas (Figura 33), sin embargo, con la hidrólisis usando alcalasa la proteína recuperada de forma soluble no fue mayor a 15% en ninguna de las

condiciones evaluadas. La tabla III muestra los resultados de las propiedades funcionales para todas las condiciones experimentales.

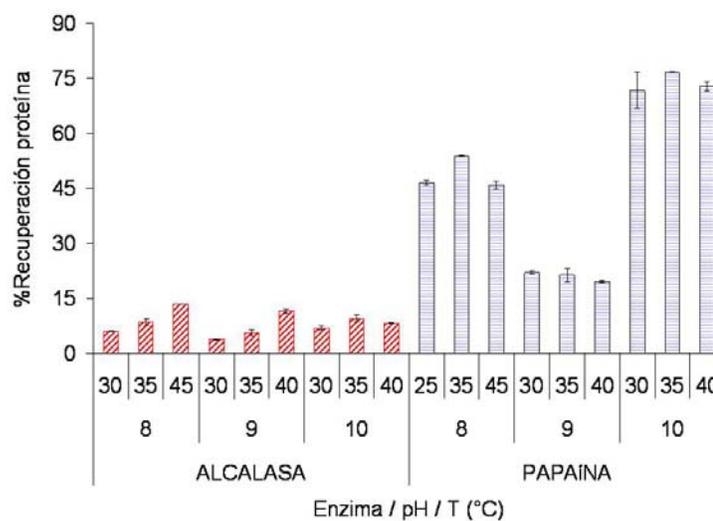


Figura 33 Recuperación de proteína soluble después de la hidrólisis con alcalasa y papaína.

Se repitieron los experimentos de hidrólisis usando papaína con calamar y caseína como control, a las condiciones en las que se presentaron los valores más altos de las propiedades funcionales. Los resultados se muestran en las figuras 34 y 35 y en ellos se observa una diferencia en el grado de hidrólisis a las diferentes condiciones evaluadas, pero no hay diferencia significativa en las propiedades funcionales, excepto para pH 9 a 30°C.

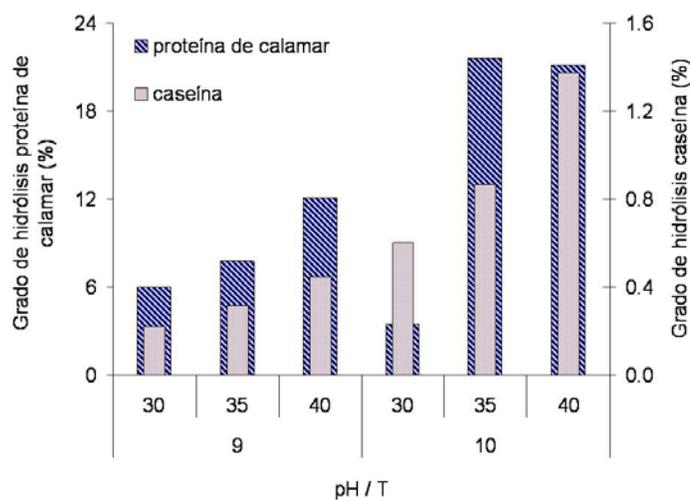


Figura 34. Efecto de pH y T en el grado de hidrólisis de calamar y caseína.

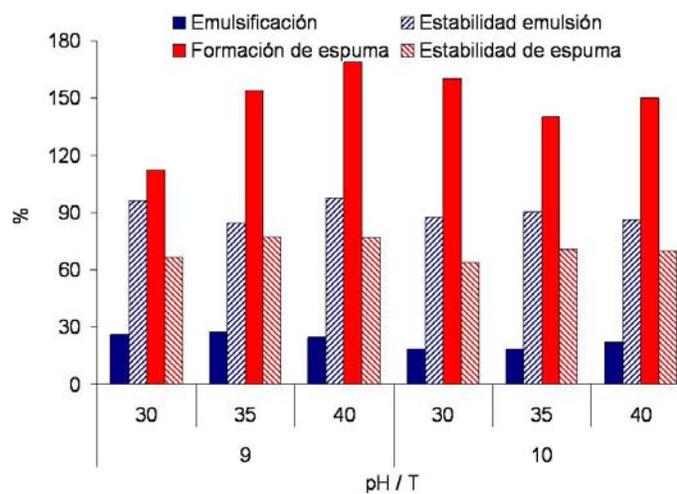


Figura 35 Efecto de pH y T de hidrólisis en las propiedades funcionales de los hidrolizados.

Tabla III. Propiedades funcionales de hidrolizados de calamar

Enzima	pH	T (°C)	EC (%)	ES (%)	W (%)	FS (%)	PR (%)	DH (%)
Alcalasa	8	30	22.0 ± 0.1	35.0 ± 3.9	35.0 ± 10.0	75.3 ± 3.0	6.12 ± 0.12	8.32 ± 0.29
	8	35	32.0 ± 0.1	40.0 ± 0.0	40.0 ± 3.0	56.8 ± 3.3	8.53 ± 0.89	6.88 ± 0.57
	8	45	27.0 ± 0.1	24.2 ± 0.8	45.0 ± 5.0	89.8 ± 0.1	13.57 ± 0.07	4.14 ± 0.28
	8	50	3.6 ± 0.3	70.9 ± 4.6	336.0 ± 0.1	89.3 ± 0.1	n. d.	3.12 ± 0.1
	9	30	21.1 ± 0.0	42.4 ± 1.1	41.5 ± 3.0	7.6 ± 3.9	3.8 ± 0.09	6.98 ± 0.44
	9	35	15.0 ± 0.0	75.5 ± 4.6	24.0 ± 6.0	48.9 ± 2.9	5.57 ± 0.93	8.56 ± 0.63
	9	40	3.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.0	97.6 ± 0.0	11.56 ± 0.5	6.07 ± 0.37
	10	30	1.2 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.4 ± 1.0	87.5 ± 0.4	6.95 ± 0.53	11.1 ± 1.07
	10	35	1.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.5	57.6 ± 0.2	9.52 ± 0.98	9.22 ± 0.94
	10	40	0.0 ± 0.0	0	0.0 ± 0.0	0.0	8.23 ± 0.1	8.11 ± 0.94
Papaína	8	25	25.2 ± 0.9	102.7 ± 12.2	245.0 ± 17.7	100.0 ± 0.0	46.54 ± 0.62	4.85 ± 0.66
	8	35	24.6 ± 0.2	98.4 ± 9.4	175.0 ± 3.0	98.6 ± 0.6	53.91 ± 0.16	6.47 ± 0.85
	8	45	27.0 ± 1.0	100.0 ± 8.5	153.0 ± 2.0	95.4 ± 0.5	45.88 ± 1.1	8.01 ± 1.61
	8	50	3.8 ± 0.5	63.5 ± 2.9	656.0 ± 0.4	74.4 ± 0.4	n. d.	3.05 ± 0.11
	9	30	22.8 ± 0.9	101.3 ± 3.5	156.3 ± 3.0	70.5 ± 4.9	21.97 ± 0.41	8.13 ± 0.55
	9	35	23.7 ± 1.9	103.1 ± 4.3	176.0 ± 0.0	100.0 ± 3.0	21.31 ± 1.66	4.45 ± 0.92
	9	45	21.7 ± 1.1	93.9 ± 0.6	137.0 ± 1.0	100.0 ± 1.7	19.58 ± 0.13	8.74 ± 0.77
	10	30	22.7 ± 1.4	94.4 ± 18.0	192.5 ± 1.4	69.6 ± 13.0	71.79 ± 4.9	5.24 ± 1.21
	10	35	20.7 ± 0.6	96.2 ± 9.7	157.0 ± 4.0	100.0 ± 0.0	76.75 ± 0.19	15.4 ± 1.21
	10	40	20.9 ± 0.3	101.2 ± 10.2	133.8 ± 1.8	52.4 ± 8.7	72.71 ± 1.29	11.2 ± 0.81
Endogenas	8	50	48.7 ± 3.0	84.7 ± 3.3	390.0 ± 0.1	100.0 ± 0.2	n. d.	n. d.

EC = capacidad de formar emulsión (%), ES = estabilidad de emulsión (%), W = capacidad de formar espuma (%), FS = estabilidad de la espuma (%), PR = protein recuperada (%), DH = grado de hidrólisis (%), n.d. = no determinado. Los valores representan los promedios de al menos tres réplicas ± SD.

DISCUSIÓN

Los valores de las propiedades funcionales como efecto de la temperatura, pueden dividirse en tres zonas. La primera corresponde al material recién preparado, etapa en la cual los tejidos están recién disgregados y podría considerarse lo más aproximado a las condiciones de proteína nativa. Después de permanecer una hora en agitación, y en un intervalo de 0 a 30°C, se dan algunas interacciones entre las proteínas y el medio (agua) originando la solubilización. A partir de 40°C se favorecen interacciones hidrofóbicas proteína-proteína que llevan a la agregación y por tanto a la pérdida de funcionalidad. Lo anterior ya se ha demostrado para músculos en general, en los que para las proteínas miofibrilares el desdoblamiento comienza a los 30-32°C, seguido de una asociación proteína-proteína a los 36-40°C, seguido de una agregación entre los 40 y 60°C, con una gelación que puede ocurrir entre los 45-50°C (Tornberg, 2005). Para las proteínas del calamar pudo haber ocurrido que a las temperaturas mayores evaluadas, los residuos hidrofóbicos quedarán expuestos ocasionando interacciones hidrofóbicas que promovieran las interacciones proteína-proteína, dando como resultado una disminución en la solubilidad de las proteínas (Kristinsson and Rasco, 2000).

Ya se demostró que la proteína del manto de calamar tiene alta capacidad de formar espuma; en esta sección se demostró además que esta capacidad puede mejorarse incrementado el pH a valores de 12. Sin embargo, a pH 9 se tiene la mayor estabilidad de espuma (100%). En cualquier condición usada, por los resultados aquí presentados, es posible proponer que la proteína de calamar se utilice en procesos de sistemas aireados.

La capacidad de emulsión es baja, sin embargo puede mejorarse llevando el sistema a pH 9, punto en el cual es mayor su capacidad así como su estabilidad. Los valores más altos de las propiedades funcionales no coinciden en un solo valor de pH, por lo que se recomienda que se mejore una sola propiedad a la vez, y siempre considerando que a sistemas alcalinos la ventaja será mayor. La disminución observada en la solubilidad y la capacidad de formar emulsión de los hidrolizados obtenidos a 50°C sugiere que el daño a la estructura de la proteína fue irreversible durante la exposición prolongada a alta temperatura, por los procesos comentados en párrafos anteriores y que en parte ha sido reportado por (Ramírez Olivas, et al., 2004). Quienes muestran que la miosina del manto de calamar tiene su punto de desnaturalización térmica cercano a los 50°C, y que disminuye durante la refrigeración. La exposición prolongada a altas temperaturas, puede favorecer las interacciones proteína-proteína entre los residuos hidrofóbicos, dando como resultado una disminución en la capacidad de emulsión, ya que la hidrofobicidad juega un papel importante determinando las propiedades de emulsión.

En comparación con la referencia de aminoácidos esenciales (AAE) recomendados por la FAO, las proteínas del músculo entero contienen menor proporción de fenilalanina, pero son más ricas en isoleucina, leucina lisina y valina. Los hidrolizados (obtenidos con papaína a 50°C) contienen mayor proporción de algunos AAE como leucina lisina y valina, que en la proteína soluble en agua, sin hidrolizar. Si bien la relación de AAE tiende a ser menor en comparación con caseína, se puede sugerir el uso de derivados de calamar, por su contenido de AAE, como una fuente de proteína de alta calidad. Para la alimentación de humanos adultos, la proteína de calamar

(entero) podría satisfacer los requerimientos de todos los AAE, excepto por fenilalanina y treonina; y de fenilalanina, leucina e isoleucina para los hidrolizados.

La hidrólisis enzimática bajo condiciones medias de temperatura y pH es una forma apropiada de mejorar la solubilización de proteína de calamar a la vez que se mejoran las propiedades funcionales. Con la hidrólisis con papaína logró recuperarse 80% de la proteína en forma soluble. Con alcalasa, no se recupera un porcentaje importante de proteína, y las propiedades funcionales no sólo no mejoran, sino que se pierden.

Ya se demostró el valor nutricional del manto de calamar, especialmente por sus aminoácidos esenciales. Adicionalmente, las propiedades funcionales ideales que son capacidad de formar espuma, capacidad de formar emulsión y, de manera especial, solubilidad a diferentes condiciones de temperatura y pH, hacen que los hidrolizados de calamar sean un ingrediente útil en alimentos. Las propiedades evaluadas sugieren una manera efectiva de utilizar la proteína de calamar y así darle un valor agregado al recurso calamar. Se requieren más estudios que de manera detallada se evalúe el efecto del proceso de secado, y que éste no afecte la funcionalidad de las proteínas. Un aspecto interesante a considerar en el procesamiento de la proteína de calamar será la temperatura de exposición, y si a $>45^{\circ}\text{C}$ las proteínas tienden a agregarse, es posible evitar esta agregación o disminuirla mediante un incremento gradual de la temperatura. Más aun, cuando la relación músculo:agua de homogeneización sea mayor a 1:5 que fue en promedio la que se utilizó en este trabajo.

CONCLUSIONES

A casi 30 años de pesca de calamar gigante no se han realizado suficientes estudios para caracterizar a la especie como materia prima en ciencia y tecnología de alimentos. Esto trae como consecuencia que arrastre en ocasiones malas prácticas en captura, manejo post-mortem y normatividad.

Aquí se demuestra que, contrario a lo reportado, el calamar fresco posee altas propiedades funcionales como son la capacidad de formación de gel, capacidad de formar espuma, emulsión y solubilidad. Cuando se almacena entre capas de hielo (0°C), su capacidad de formación de gel no se ve significativamente afectada, al menos durante 16 días de almacenamiento.

Cuando el manto (entero) es almacenado a las mismas condiciones, las fibras musculares se separan generando cambios que al parecer son los que modifican negativamente la textura del manto como producto. En cambio, la congelación a -20°C también parece tener efecto sobre la textura del manto por la agregación que se da en las fibras musculares. En cuanto a las propiedades funcionales, el almacenamiento del manto en congelación (-20°C), resulta en valores altos de su capacidad de formar espuma y emulsión. Queda para estudios posteriores la búsqueda de una temperatura de almacenamiento apropiada, en la cual la relación tiempo-temperatura se pondere en función de las propiedades funcionales que se desean conservar o mejorar, y del producto o proceso al cual será incluido el manto de calamar.

Para el procesamiento, se debe considerar una mínima exposición a temperaturas mayores a 45°C, a menos que se quiera mejorar únicamente la capacidad de formar espuma. Esta misma propiedad es posible mejorarla, incrementando el valor de pH. Esto conduce a sugerir a las proteínas de calamar como ingrediente en sistemas aireados, como merengues.

La capacidad de emulsión y su estabilidad se mejoró a pH 9, y se sugiere que se continúen las investigaciones alrededor de este punto para optimizar esta propiedad.

La baja actividad enzimática endógena permite tener un mejor control durante la hidrólisis enzimática. Cuando se lleva la reacción a un DH 3%, los hidrolizados tienen alta capacidad de formación de espuma. La reducción de la capacidad de formación de emulsión y la solubilidad es significativa, posiblemente debida a la inestabilidad térmica de las proteínas y a las interacciones que se dan cuando las proteínas son sometidas a altas temperaturas.

La mejor condición para recuperar proteína (cerca de 80%) es hidrolizando con papaína, a pH 10, a las tres temperaturas evaluadas. La mayor formación de espuma la presentan los hidrolizados obtenidos con papaína a pH8, 50°C. Seguida de los hidrolizados obtenidos igual con papaína, pero a 30°C, pH 8. La mayor capacidad de emulsión la presentaron los hidrolizados obtenidos con alcalasa, a 35°C, pH 8.

COMENTARIO FINAL

Para aprovechar mejor este recurso marino, hay varios aspectos susceptibles de mejorar como son las condiciones de manejo post-captura y el desarrollo de tecnologías para la producción y transformación de alimentos basadas en calamar. La comercialización del calamar está restringido en parte debido al precario manejo que se le da al organismo después de capturado. Esto significa que si no se toman en cuenta los cambios químicos y bioquímicos que se presentan después de la captura, y que podrían afectar negativamente la apariencia, textura y las propiedades funcionales.

Por el contrario, un adecuado manejo *post mortem* permitirá la comercialización de un producto con un adecuado nivel de frescura. Una de las opciones para mejorar el manejo post-captura de calamar, sería aprovechar la capacidad y condiciones de bodega de la flota camaronera para matar y mantener el producto a baja temperatura y así conservarlo mejor, esto desde luego sería durante el tiempo de veda del camarón. Otra opción sería la instalación o adaptación en tierra, de tinas para baños de agua-hielo y mesas de eviscerado con buenas prácticas de manejo del producto, incluyendo condiciones higiénicas (sanitizadas, por ejemplo).

LITERATURA CITADA

- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.
- Adler-Nissen, J., S. Eriksend, and H. S. Olsen. 1983. Improvement of the functionality of vegetable proteins by controlled enzymatic hydrolysis. *Qual Plant Plant Foods Hum Nutr.* 32:411-423.
- Ando, M., M. Ando, Y. Tsukamasa, Y. Makinodan, and M. Miyoshi. 1999. Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by freshness. *Journal of Food Science.* 64:659-662.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington Virginia, USA.
- Ayensa, M., M. Montero, A. Borderías, and J. Hurtado. 2002. Influence of some protease inhibitors on gelation of squid muscle. *Journal of Food Science.* 67:1636-1641.
- Bickerstaff, G. 2005. Subject: Functional properties of proteins. <http://www.biol.paisley.ac.uk/Courses/Enzymes/glossary/Function.htm>. Accessed December, 2005.
- Bourne, M. C. 1978. Texture Profile Analysis. *Food Technology.* 62-66, 72.
- Calvo-Hurtado, E. N. 2001. Determinación del índice "K" en muestras comerciales de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y su relación con indicadores que definen su calidad. Licenciatura, Universidad de Sorona, Hermosillo, Sonora.
- Chobert, J. M., C. Bertrand-Haarb, and M. G. Nicolas. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 36:883-892.
- Clemente, A. 2002. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Technology.* 11:254-262.
- Córdova-Murueta, J. H. and F. L. García-Carreño. 2002. Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture.* 210:371-384.
- Damodaran, F., ed. 1996. *Functional Properties en Food Proteins, Properties and Characterization.* VCH.
- Diniz, F. and A. Martin. 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science And Technology.* 30:266-272.
- Dziuba, J., P. Minkiewicz, and D. Natecz. 1999. Biologically active peptides from plant and animal proteins. *Polish Journal of Food and Nutrition Science.* 8/49(1):3-16.
- Dzwolak and Ziajka. 1999. Enzymatic hydrolysis of milk proteins under alkaline and acidic conditions. *Journal of Food Technology.* 62:393-395.

- Ezquerria-Brauer, J. M., N. F. Haard, R. Ramírez-Olivas, H. Olivas-Burrola, and C. J. Velázquez-Sánchez. 2002. Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Journal of Food Biochemistry*. 26:459-475.
- FAO. 2003. Subject: Species identification sheets.
<http://www.fao.org/figis/servlet/FiRefServlet?ds=species&fid=2721>. Accessed.
- FAO/WHO/UNU. 1985. Energy and Protein Requirements. Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation, WHO Technical Report. Vol. No. 72. WHO, Geneva.
- Foucat, L., R. G. Taylor, R. Labas, and J. P. Renou. 2001. Characterization of frozen fish by NMR imaging and histology. *American Laboratory (Shelton)*.38-43.
- Gildberg, A. 1993. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochemistry*. 28:1-15.
- Gómez-Guillén, M., A. Borderías, and P. Montero. 1997. Salt, nonmuscle proteins, and hydrocolloids affecting rigidity changes during gelation of giant Squid (*Dosidicus gigas*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45:616-621.
- Gómez-Guillén, M., J. Hurtado, and P. Montero. 2002. Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle. *Journal of Food Science*. 67:2491-2496.
- Gómez-Guillén, M., O. Martínez-Alvarez, and P. Montero. 2003. Functional and thermal gelation properties of squid mantle proteins affected by chilled and frozen storage. *Journal of Food Science*. 68:1962-1967.
- Hall, G. M. 1996. Basic concepts. Page 266 *in* *Methods of testing protein functionality*. G. M. Hall, ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Hammershoj, M., H. C. Rasmussen, J. H. Carstens, and H. Pedersen. 2006. Dry-pasteurization of egg albumen powder in a fluidized bed. II. Effect on functional properties: gelation and foaming. *International Journal of Food Science and Technology*. 41(3):263-274. Online. Available: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2005.01059.x>.
- Hashimoto, K., S. Watabe, M. Kono, and K. Shiro. 1979. Muscle protein composition of sardine and mackerel. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 45(11):1435-1441.
- Herrero, A., P. Carmona, M. L. Garcia, M. T. Solas, and C. M. 2005. Ultrastructural changes and structure and mobility of myofibrils in frozen-stored hake (*Merluccius merluccius* L.) muscle: relationship with functionality and texture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(7):2558-2566.
- Hill, S. E. 1996. Emulsions. Page 266 *in* *Methods of testing protein functionality*. G. M. Hall, ed. Blackie Academic & Professional, London.

- Howard, D. W. and C. S. Smith. 1983. Histological techniques for marine bivalve mollusks. Page 97 in NOAA Technical Memorandum NMFS-F/NEC-25. US. Department Of Commerce, Woods Hole, Massachusetts.
- INP. 1999. Subject: Informe Anual del Instituto Nacional de Pesca. www.inp.mx. Accessed.
- ITIS. 2004. Subject: *Dosidicus gigas*. www.itis.usda.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt. Accessed.
- Jaquet, N. and D. Gendron. 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. *Marine Biology*. 141:591-601.
- Kawai, Y., S. Fujimura, and K. Takahashi. 1998. Functional properties of chemically modified proteins of sardine meal defatted with 1-propanol. *International Journal of Food Science and Technology*. 33(4):385-391. Online. Available: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2621.1998.00159.x>.
- Kijowski, J. 2001. Muscle proteins. Pages 490 (233-269) in *Chemical and functional properties of food proteins*. Z. E. Sirkorski, ed. Technomic Publishing Company, Pennsylvania, USA.
- Konno, K., C. Young-Je, T. Yoshioka, P. Shinho, and N. Seki. 2003. Thermal denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo squid *Docidicus [sic] gigas*. *Fisheries Science*. 69(1):204-209. Online. Available: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1444-2906.2003.00607.x>.
- Kristinsson, H. G. and H. O. Hultin. 2003. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51:5103-5110.
- Kristinsson, H. G. and B. A. Rasco. 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Volume 40(1):43 - 81.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *227(5259):680-685*. Online. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lian, P. and C. Lee. 2003. Characterization of squid hydrolysate for its potential as aquaculture feed ingredients. The proceedings of the TAFT 2003 Conference.
- Lian, P. Z., C. M. Lee, and E. Park. 2005. Characterization of Squid-Processing Byproduct Hydrolysate and Its Potential as Aquaculture Feed Ingredient. *J. Agric. Food Chem.* 53(14):5587-5592. Online. Available: <http://dx.doi.org/10.1021/jf050402w>.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275. Online. Available: <http://www.jbc.org>.

- Markaida, U., J. J. C. Rosenthal, and W. F. Gilly. 2005. Tagging studies on the jumbo squid (*Dosidicus gigas*) in the Gulf of California, Mexico. *Fishery Bulletin*. 103(1):219-226.
- Martin, A. M. 1998. Fisheries waste biomass: bioconversion alternatives. Pages 449-479 *in* Bioconversion of waste materials to industrial products. A. M. Martin, ed. Blackie Academic and Professional, London, New York.
- Matsumura, Y. and T. Mori. 1996. Gelation. Page 266 *in* Methods of testing protein functionality. G. M. Hall, ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Miura-Yokota, Y., Y. Matsubara, T. Ebihara, S. Hattori, and S. Irie. 2004. A cysteine-activated protease isolated from *Todarodes pacificus* squid degrades collagen below its denaturation temperature. *Connective Tissue Research*. 45(2):109-121(113).
- Morales-Bojorquez, E., A. Hernandez-Herrera, M. Nevarez-Martinez, M. Cisneros-Mata, and F. Guerrero-Escobedo. 2001. Population size and exploitation of giant squid (*Dosidicus gigas* D'Orbigny, 1835) in the Gulf of California, Mexico. *Scientia Marina (Barcelona)*. 65(1):75-80.
- Navarrete Del Toro, M. A. and F. L. García-Carreño. 2002. Evaluation of the progress of protein hydrolysis and protein digestibility. Unit B2.3 Part B. Chapter B2: Biochemical compositional analyses of proteins. *in* Current Protocols in Food Analytical Chemistry (Supplement 4). John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Nigmatullin, C. M., K. Nesis, and A. Arkhipkin. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*. 54:9-19.
- Ohashi, E., M. Okamoto, A. Ozawa, and T. Fujita. 1991. Characterization of common squid using several freshness indicators. *Journal of Food Science*. 56:161-163, 174.
- Paredi, M. E. and M. Crupkin. 1997. Biochemical Properties of Actomyosin from Frozen Stored Mantles of Squid (*Illex argentinus*) at Different Sexual Maturation Stages. *J. Agric. Food Chem.* 45(5):1629-1632. Online. Available: <http://dx.doi.org/10.1021/jf960776c>.
- Peña-Ramos, E. A. and Y. L. Xiong. 2001. Antioxidative Activity of Whey Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *J. Dairy Sci.* 84(12):2577-2583. Online. Available: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/84/12/2577>.
- Poulter, R. G., D. A. Ledward, S. Godber, G. Hall, and B. Rowlands. 1985. Heat stability of fish muscle proteins. *Journal of Food Technology*. 20:203-217.
- Ramírez, J. A., M. O. Martín-Polo, and E. Bandman. 2000. Fish myosin aggregation as affected by freezing and initial physical state. *Journal of Food Science*. 65(4):556-560.
- Ramírez Olivas, R., O. Rouzaud Sáñez, N. F. Haard, R. Pacheco Aguilar, and J. M. Ezquerro Brauer. 2004. Changes in firmness and thermal behavior of ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *European Food Research and Technology*. 219(4):312-315. Online. Available:

<http://www.springerlink.com/openurl.asp?genre=article&id=doi:10.1007/s00217-004-0991-5>.

Ruiz-Capillas, C., A. Moral, J. Morales, and P. Montero. 2003. Characterization and functionality of frozen muscle protein in volador (*Illex coindetii*), Pota (*Todaropsis eblanae*) and octopus (*Eledone cirrosa*). *Journal of Food Science*. 68(7):2164-2168.

Sánchez-Alonso, I., M. Careche, and A. J. Borderías. 2007. Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Food Chem*. 100:48-54.

Sánchez-Brambilia, G. Y., G. Álvarez-Manila, F. Soto-Cordova, B. G. Lyon, and R. Pacheco-Aguilar. 2004. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 13(1):55-67.

SEMARNAP. 2000. Subject: Informe anual de captura y recursos peseros. www.semarnap.org. Accessed.

Sikorski, Z. E. a. and I. Kolodziejska. 1986. The composition and properties of squid meat. *Food Chemistry*. 20:213-224.

Suzuki, T. 1981. Kamaboko (fish cake). Pages 62-191 *in* Fish and krill protein processing technology. T. Suzuki, ed. Applied Science Publishers Ltd, London.

Tornberg, E. 2005. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. *Meat Science*. 70:493-508.

Ueng, Y. E. and C. J. Chow. 1998. Textural and histological changes of different squid mantle muscle during frozen storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:4728-4733.

Vázquez-Ortiz, F. A., G. Caire, I. Higuera-Ciapara, and G. Hernández. 1995. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*. 19(18):2059-2068.

Venugopal, V., R. Lakshmanan, S. N. Doke, and D. R. Bongirwar. 2000. Enzymes in fish processing, biosensors and quality control: a review. *Food Biotechnology*. 14(1&2):21-77.

Vojdani, F. 1996. Solubility. Page 266 *in* Methods of testing protein functionality. G. M. Hall, ed. Blackie Academic & Professional, London.

Wilde, P. J. and D. C. Clark. 1996. Foam formation and stability. Page 266 *in* Methods of testing protein functionality. G. M. Hall, ed. Blackie Academic & Professional, London.