



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos
del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el
almacenamiento en refrigeración o congelación”**

TESIS
Que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología
PRESENTA

Octavio Dublán García

Director: Dra. Edith Ponce Alquicira

Mexico D.F.

Junio 2006

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
comunicación de los resultados que presentó:

Octavio Dublán García

El día 5 de junio del 2006

Dra. Edith Ponce Alquicira
Biotecnología, UAM-I

Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Biotecnología, UAM-I

Dr. Ramón Cruz Camarillo
Microbiología, ENCB, IPN

Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya
Biotecnología, CINVESTAV, IPN

Dr. Alfonso Totosaus Sánchez
TESE, Ecatepec

“El posgrado en Biotecnología de La Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrado (PNP) del CONACyT con categoría de alto nivel, con el convenio **471-0/Doctorado en Biotecnología**”

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología de la UAM-Iztapalapa y en el laboratorio de reología del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN.

“En los momentos de crisis, sólo la imaginación es más importante que el conocimiento”.

ALBERT EINSTEIN.

Dedicatorias:

- A mis padres y hermanas por todo el apoyo, cariño, comprensión y paciencia que me han tenido toda la vida. Han sido un pilar muy importante para alcanzar las metas que me he propuesto.

- A todas aquellas personas que sin saberlo están involucradas en todos estos proyectos y que sin su apoyo no sería posible la realización de éstos.

Agradecimientos

- A Dios por darme la fortaleza de seguir adelante en cada uno de los proyectos tanto de vida como profesionales que se me han ido presentado y poderlos compartir con la gente que quiero, amo y estimo.
- A todos mis compañeros de laboratorio por todo su apoyo y amistad.
- A todos y cada uno de mis queridos escolapios, amigos entrañables todos, son y seguirán siendo parte muy importante de mi vida.
- A Basy, Raquelita y Hugo; por su amistad y por estar en todo momento en este largo sendero.
- A Rodrigo, Eduardo, Enrique y Fernando; por ser una parte muy importante en esta nueva etapa de mi vida.
- A Rosa María Pelcastre; porque en las buenas y en las malas siempre estás ahí.
- A las hermanas Alba León; por su apoyo, cariño y amistad.
- A mis alumnos; quienes espero que aprendan un poco de mí, comparado con lo que yo aprendo de ellos.
- A la Dra Edith Ponce, no solo por todo su apoyo y confianza durante todo este tiempo, sino también por su amistad.
- A la Dra Isabel Guerrero; por sus enseñanzas, gran apoyo y amistad.
- Al Ing. Miguel Márquez; por su amistad y apoyo técnico en la realización experimental de este proyecto.
- Al Jurado; por sus consejos y comentarios en la realización de este trabajo.
- A la UAM-Iztapalapa; por darme la oportunidad de prepararme dentro de sus aulas.
- A CONACYT; por la beca otorgada para la realización de este posgrado.

INDICE

<i>i.</i> Índice de figuras.....	1
<i>ii.</i> Índice de gráficas.....	2
<i>iii.</i> Índice de tablas.....	5
<i>iv.</i> Resumen.....	8
<i>v.</i> Abstract.....	11
1. Introducción.....	14
2. Revisión Bibliográfica.....	17
2.1 Importancia económica del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) en México.....	17
2.1.1 Exportaciones.....	19
2.1.2 Asia, importación del calamar.....	20
2.1.3 EUA, importación del calamar.....	21
2.2 Composición del tejido muscular del calamar.....	21
2.3 Clasificación de las proteínas musculares.....	22
2.3.1 Proteínas miofibrilares.....	22
2.3.2 Proteínas solubles o sarcoplásmicas.....	23
2.3.3 Proteínas insolubles.....	24
2.4 Funcionalidad de las proteínas musculares.....	25
2.4.1 Gelificación.....	25
2.4.2 Gelificación de proteínas globulares por calor.....	26
2.4.3 Gelificación de proteínas miofibrilares.....	29
2.4.4 Caracterización de geles.....	32
2.4.4.1 Viscoelasticidad.....	33
2.4.4.2 Medidas dinámicas.....	33
2.5 Enzimas proteolíticas presentes en el tejido muscular.....	34

2.5.1 Acción de proteasas sobre la estructura miofibrilar.....	36
2.5.2 Efecto de calpainas sobre la estructura miofibrilar.....	36
2.5.3 Efecto sobre la miosina y actina.....	36
2.6 Efecto del almacenamiento de productos marinos en congelación.....	37
2.6.1 Consecuencias de la velocidad de congelación.....	38
2.6.2 Reacciones secundarias durante el almacenamiento.....	41
3. Justificación.....	45
4. Hipótesis.....	48
5. Objetivos.....	50
5.1 Objetivo general.....	50
5.2 Objetivos particulares.....	50
6. Metodología.....	52
6.1 Diagrama general de trabajo.....	52
6.2 Preparación de la muestra.....	53
6.3 Reactivos.....	53
6.4 Actividad proteolítica del extracto crudo del músculo del calamar.....	54
6.5 Capacidad de retención de agua.....	55
6.6 pH.....	55
6.7 Solubilidad.....	55
6.8 Determinación de grupos sulfhidrilos.....	56
6.9 Medición de formaldehído (FA).....	57
6.10 Cambios estructurales mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).....	57
6.11 Extracción de proteínas miofibrilares.....	59

6.12 Propiedades de gelificación.....	60
6.12.1 Penetración de geles.....	60
6.13 Propiedades estructurales y reológicas de proteínas musculares.....	61
6.14 SDS-PAGE.....	61
6.15 Estudios reológicos dinámicos	62
6.16 Análisis estadísticos.....	63
7. Resultados y discusión.....	65
7.1 Actividad proteolítica del extracto crudo del músculo del calamar.....	66
7.2 pH.....	70
7.3 Capacidad de retención de agua	72
7.4 Solubilidad.....	75
7.5 Determinación de grupos sulfhidrilos.....	78
7.6 Determinación de formaldehído.....	81
7.7 Perfil electroforético de las proteínas miofibrilares.....	83
7.8 Cambios estructurales mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).....	86
7.9 Propiedades de gelificación.....	91
7.10 Estudios reológicos dinámicos	98
7.11 Resumen de resultados.....	108
8. Conclusiones.....	112
9. Bibliografía.....	115
10. Anexos.....	130
11. Productos generados.....	141

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1.	Representación esquemática del manto del calamar. Cubo ampliado del espesor completo del manto	22
Figura 2.	Degradación enzimática de OTMA y formación de DMA y FA	42
Figura 3.	Algunos factores que influyen sobre la desnaturalización de las proteínas de productos marinos durante el almacenamiento en congelación.....	43
Figura 4.	PAGE-SDS de las proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), a 9 días de almacenamiento, teñido con azul de coomasie. Carril I: Marcador de pesos moleculares. Carril II: Proteínas miofibrilares, tiempo cero. Carril III. Día 2. Carril IV día 4. Carril V: día 6. Carril VI: día 9.....	85
Figura 5.	PAGE-SDS de las proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), a 4 meses de almacenamiento, teñido con azul de Coomasie. Carril I: Marcador de pesos moleculares. Carril II: tiempo cero. Carril III: -20 °C (primer mes). Carril IV: -80 °C (primer mes). Carril V: -20 °C (segundo mes). Carril VI: -80 °C (segundo mes). Carril VII: -20 °C (tercer mes). Carril VIII: -80 °C (tercer mes). Carril IX: -20 °C (cuarto mes). Carril X: -80 °C (cuarto mes).....	86
Figura 6.	Micrográficas del manto del calamar gigante almacenado en refrigeración a 4°C. Aumento 2000x.....	88
Figura 7.	Micrográficas del manto del calamar gigante almacenado en congelación a -20 °C y -80°C. Aumento 2000x.....	90

INDICE DE GRÁFICAS:

Gráfica 1.	Producción del calamar gigante en México (Anuario estadístico de pesca 2003, 2004, 2005; datos preliminares para 2004 y 2005).....	17
Gráfica 2.	Actividad proteolítica del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado en refrigeración a 4°C.....	67
Gráfica 3.	Actividad proteolítica a del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado en congelación a -20° C.....	68
Gráfica 4.	Actividad proteolítica a del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado en congelación a -80 °C.....	68
Gráfica 5.	Cambios en el pH del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a 4°C.....	71
Gráfica 6.	Cambios en el pH del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -20 y a -80°C	72
Gráfica 7.	Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), almacenado a 4°C	73
Gráfica 8.	Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>), almacenado a -20 y -80°C.	75
Gráfica 9.	Efecto del almacenamiento en la solubilidad de proteínas miofibrilares del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a 4°C.....	76
Gráfica 10.	Efecto del almacenamiento en la solubilidad de proteínas miofibrilares del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -20 y a -80 °C.....	78
Gráfica 11.	Número de grupos sulfhidrilos (μmoles -SH/g de proteína) en el tejido muscular del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante el almacenamiento a 4°C.....	79
Gráfica 12.	Número de grupos sulfhidrilos (μmoles -SH/g de proteína) en el tejido muscular del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) durante el almacenamiento a -20 y -80 °C.....	80
Gráfica 13.	Producción de FA en el músculo del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a 4°C.....	82

Gráfica 14. Producción de FA en el músculo del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -20 y a -80°C	82
Gráfica 15. Efecto del pH en la fuerza del gel de proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	91
Gráfica 16. Efecto de la penetración en la fuerza del gel de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	92
Gráfica 17. Efecto de la velocidad de penetración en la fuerza del gel de proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	93
Gráfica 18. Trabajo total de la fuerza de gel de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	94
Gráfica 19. Efecto del almacenamiento a 4°C en la fuerza de gelificación de las proteínas miofibrilares del calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)...	96
Gráfica 20. Efecto del almacenamiento a -20 y -80°C en la fuerza de gelificación de las proteínas miofibrilares.....	97
Gráfica 21. Efecto del almacenamiento en la fuerza de gelificación de las proteínas miofibrilares durante el periodo de almacenamiento a 4°C . (A): Tiempo 0 de almacenamiento, (B): 4 días de almacenamiento, (C): 9 días de almacenamiento.	98
Gráfica 22. Comportamiento de los parámetros dinámicos durante el tratamiento térmico del homogeneizado del músculo del calamar...	100
Gráfica 23. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') en función de la temperatura del manto de calamar gigante almacenado a 4°C	101
Gráfica 24. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado en congelación a -20°C	103
Gráfica 25. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -20°C	104
Gráfica 26. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -20°C	104

Gráfica 27. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -80°C	105
Gráfica 28. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -80°C	105
Gráfica 29. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -80°C	106
Gráfica 30. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>) almacenado a -80°C	106

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1.	Caracterización de geles.....	32
Tabla 2.	Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto del pH sobre la fuerza de gelificación.....	92
Tabla 3.	Análisis de varianza para la actividad en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.....	132
Tabla 4.	Análisis de varianza para la actividad enzimática en función del tiempo de almacenamiento a -20°C.....	132
Tabla 5.	Análisis de varianza para la actividad enzimática en función del tiempo de almacenamiento a -80°C.....	132
Tabla 6.	Análisis de varianza para el pH en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.....	132
Tabla 7.	Análisis de varianza para el pH en función del tiempo de almacenamiento a 20°C.....	133
Tabla 8.	Análisis de varianza para el pH en función del tiempo de almacenamiento a -80°C.....	133
Tabla 9.	Análisis de varianza para la CRA en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.....	133
Tabla 10.	Análisis de varianza para la CRA en función del tiempo de almacenamiento a -20°C.....	133
Tabla 11.	Análisis de varianza para la CRA en función del tiempo de almacenamiento a -80°C.....	133
Tabla 12.	Análisis de varianza para de la solubilidad de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a 4°C.....	134
Tabla 13.	Análisis de varianza para de la solubilidad de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -20°C.....	134
Tabla 14.	Análisis de varianza para de la solubilidad de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -80°C..	134

Tabla 15.	Análisis de varianza para grupos sulfhidrilos de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a 4°C.....	134
Tabla 16.	Análisis de varianza para grupos sulfhidrilos de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -20°C..	134
Tabla 17.	Análisis de varianza para grupos sulfhidrilos de las proteínas del manto el calamar gigante en función del almacenamiento a -80°C....	135
Tabla 18.	Análisis de varianza para Formaldehído de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a 4°C.....	135
Tabla 19.	Análisis de varianza para Formaldehído de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -20°C.....	135
Tabla 20.	Análisis de varianza para Formaldehído de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -80°C.....	135
Tabla 21.	Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante.....	135
Tabla 22.	Análisis de varianza para el efecto del porcentaje de penetración sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante.....	136
Tabla 23.	Análisis de varianza para el efecto de la velocidad sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante.....	136
Tabla 24.	Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante almacenado a 4°C.....	136
Tabla 25.	Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante almacenado a -20°C.....	136
Tabla 26.	Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante almacenado a -80°C.....	136

Tabla 27.	Análisis de correlación para el calamar gigante almacenado a 4°C..	137
Tabla 28.	Análisis de correlación para el calamar gigante almacenado a -20°C.	138
Tabla 29.	Análisis de correlación para el calamar gigante almacenado a -80°C.	139

Resumen

Resumen

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es un cefalópodo del género *Ommastrephes* abundante en la costa del Pacífico de México. El ochenta por ciento del total del calamar mexicano es exportado como materia prima a Corea, Estados Unidos y Canadá, entre otros países. Uno de los problemas principales para la comercialización y transporte del calamar gigante (CG) es su rápido deterioro, aún en congelación, en comparación con otros productos marinos, disminuyendo su calidad y oportunidades de proceso y comercialización. Como otros cefalópodos, el CG tiene un ciclo de vida corto, con un elevado recambio proteico, asociado con una alta actividad proteolítica endógena.

Si bien hay una gran cantidad de información referente al deterioro de productos marinos durante el almacenamiento en congelación, la mayor parte de los estudios están enfocados al tejido muscular de diversas especies de pescado. Considerando que hay muy pocos reportes referentes a la evaluación integral de las propiedades fisicoquímicas y reológicas del CG durante el almacenamiento en refrigeración y congelación; el objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios que sufre el manto de calamar gigante durante su almacén en refrigeración y congelación en relación con el pH, actividad proteolítica, retención de agua, microestructura y el comportamiento reológico, a fin de obtener información básica para un manejo apropiado de este recurso marino de importancia económica en México.

Se midió una alta actividad proteolítica particularmente en el sustrato almacenado en refrigeración, y un descenso gradual de este parámetro durante el almacenamiento en congelación. La cadena pesada de la miosina fue degradada

completamente durante el almacenamiento en refrigeración repercutiendo en una disminución significativa ($p < 0.001$) en la capacidad de retención de agua, textura y capacidad de gelificación. Asimismo, el deterioro del músculo fue evidente en la observación al microscopio electrónico de barrido.

De la misma forma, los efectos del manto de calamar almacenado en congelación fueron estudiados en relación con cambios de pH, actividad enzimática, microestructura, formaldehído (FA), la solubilidad de proteína, propiedades de gelificación, grupos-SH y el comportamiento reológico. El pH permaneció sin cambios significativos durante dos primeros meses de almacenamiento en congelación, pero, después del tercer mes una disminución de pH fue observada mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$). La actividad proteolítica disminuyó paulatinamente durante el almacenamiento en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los niveles de FA obtenidos después del estudio fueron bajos ($3.2\text{ mg}/100\text{g}$), indicando una buena calidad de esta especie; sin embargo, es posible que la presencia de FA puede actuar como un agente que forma enlaces cruzados entre proteínas, causando una reducción en la solubilidad y en la capacidad de gelificación. Se observó una disminución en la solubilidad asociada con una disminución de grupos reactivos-SH y menor fuerza de gelificación durante el almacenamiento en congelación. La degradación de proteínas miofibrilares, principalmente miosina, puede afectar la formación de una matriz en un sistema gel, así como sus características reológicas y parámetros de textura, solubilidad y microestructura, en particular cuando las muestras de calamar fueron almacenadas por más de cuatro meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Abstract

Abstract

Giant squid (*Dosidicus gigas*) is a cephalopod of the *Ommastrephes* genus abundant in the Pacific coast of Mexico. Eighty percent of total Mexican catch is exported as raw material to Korea, United States and Canada, among other countries. One of the main problems for Giant squid (GS) merchandizing and transportation is the rapid deterioration that undergoes, even under frozen conditions, in comparison with other seafood, thus reducing shelf-life and further processing opportunities. Like other cephalopods, GS has a short life cycle, with an elevated body proteins turnover rate, associated with a high endogenous proteolytic activity as compared with other marine species. Physicochemical properties of extracted seafood proteins give more in-depth information on changes that occurs at molecular level during frozen storage.

Simple tests such as gelling shows the general condition of proteins; while other tests monitor changes in the more susceptible functional groups of proteins, such as sulfhydryls groups (-SH), that reveal the existence of protein cross-linking, and can explain aggregation phenomena. In addition, examination of the ultra structural arrangements of seafood muscle has been used to detect disturbances or damage in macro- and microstructures of tissues. Most studies are focused on the study of fish species; however, there are few reports regarding cephalopods quality deterioration during frozen storage. Therefore, the objective of this work was to examine the effects of refrigeration and frozen storage on mantle squid in relation to pH, proteolysis, microstructure and rheological behavior in order to provide basic information for the better utilization of this marine resource.

Fresh squid mantle muscle is creamy-white, elastic and firm with a characteristic smell. However, during refrigeration and frozen storage it became slightly dark; loss firmness and elasticity, and its particular smell turns unpleasant. High proteolytic activity was observed in refrigerated samples, but activity decreased gradually during frozen storage. Myosin heavy chain was degraded during refrigeration storage as shown on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis patterns resulting in a significant decrease ($p < 0.001$) in muscle water holding capacity, texture and gelling capacity. Muscle deterioration was evident in scanning electron micrographs, where the initial compact structure loosened during storage.

In addition the effects of mantle squid frozen storage in relation to changes in pH, proteolysis, formaldehyde (FA) microstructure and changes in the myofibrillar protein fraction were evaluated by measuring protein solubility, gelling properties, -SH groups, SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and rheological behavior. Data for pH remained without changes during the first two months of freezing storage, but after the third month a pH decrease was observed showing significant differences ($P < 0.05$). The proteolytic activity did not decrease completely during frozen storage at -20°C or -80°C , thus it can be said that, frozen stored squid mantle has ongoing protease activity which can alter structural as well as rheological properties during storage, thaw and further manipulation. Levels of FA obtained after the study were low (3.2 mg/100g), indicating a good quality of this species, however, it is possible that the presence of FA could act as a cross-linking agent among proteins, causing a reduction in gel-forming ability. A decrease in solubility was

noticed associated with a greater decrease of reactive –SH groups and decrease of gelling strength force throughout the study during frozen storage. Degradation of myofibrillar proteins, mainly myosin, would affect the matrix formation as well as their characteristics such as rheological and texture parameters, solubility and microstructure particularly when squid samples were stored more than four months at –20 or –80 °C.

Introducción

1. INTRODUCCION

El calamar gigante *Dosidicus gigas* pertenece a la familia *Ommastrephidae* y a la subfamilia *Ommastrephinae*; es un recurso altamente migratorio que se ha presentado por “pulsos” de varios años en las costas mexicanas. *Dosidicus gigas* tiene un ciclo de vida corto de máximo dos años, presenta altas tasas de crecimiento, alcanza tallas promedio de 87 cm de longitud de manto (LM) y un peso de 13 Kg (Hernández y col., 1996), aunque De la Rosa y col. (1992) registraron organismos de una longitud de 97 cm de LM y 37 Kg. La porción comestible del calamar corresponde a un 80% del peso total y ésta contiene alrededor de 20% de proteína, 2.2 % de grasa, 77% de agua y 1.2% de minerales.

La pesca del calamar gigante ha adquirido importancia en los litorales de las costas del Pacífico y en particular de Baja California. El volumen de exportación de este recurso se encuentra dentro de los primeros diez productos pesqueros de mayor demanda (SEMARNAP, 2003). Japón consume cerca del 31% de la producción mundial de éste cefalópodo; seguido de Corea, Taiwán, y Hong Kong que en conjunto utilizan el 30%; mientras que Italia, Francia, Grecia, España, Portugal y Alemania, consumen el 15% (Anónimo, 1992; Anuario de Pesca, 2003). El calamar se distribuye en diferentes presentaciones ya sea fresco, seco, salado o enlatado en conserva, pero la mayor parte se comercializa en congelación (CIBNOR, 2003).

La congelación es un excelente procedimiento para conservar la calidad de productos marinos. El descenso de la temperatura promueve una deshidratación interna por formación de cristales de hielo, inhibiendo el desarrollo de microorganismos. Sin embargo, la pérdida de la calidad de los tejidos animales

durante la conservación en congelación puede estar relacionada con la técnica de congelación y/o con las características propias del tejido (Hultin,1993). Los peces y mariscos aún en congelación presentan una rápida pérdida de textura; proteolisis, desnaturalización y agregación (Okamoto y col., 1993; Ashie y col., 1996; Wako y col., 1996; Ashie y Simpson, 1997). Dado que no se dispone de mucha información del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), producto de importancia económica en México, es necesario llevar a cabo estudios sobre los cambios estructurales y fisicoquímicos de este producto durante el almacenamiento en refrigeración y congelación. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en relación con la funcionalidad y estructura del manto del calamar gigante.

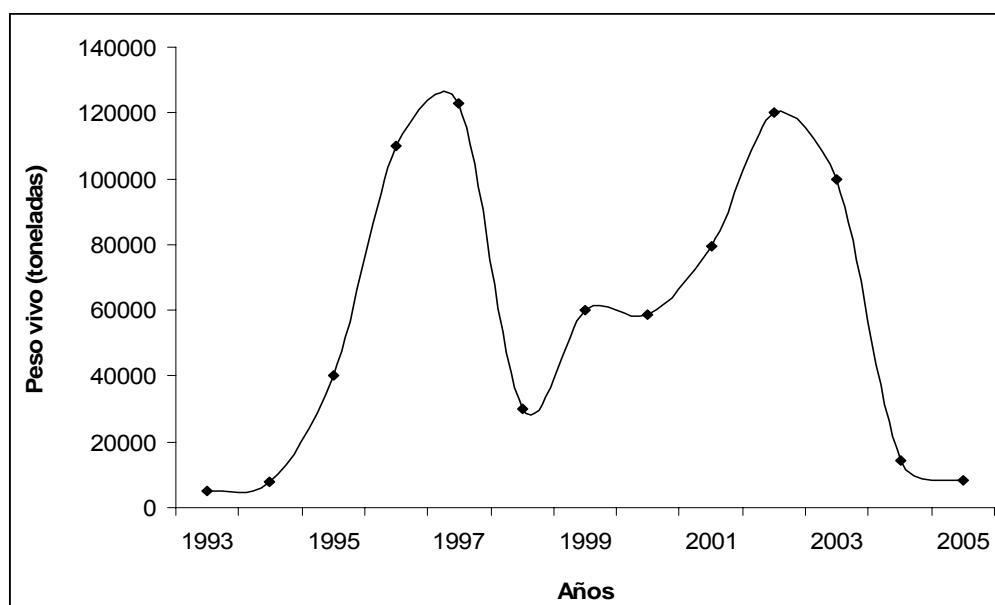
Revisión Bibliográfica

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. IMPORTANCIA ECONOMICA DEL CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*)

EN MEXICO

El calamar gigante *Dosidicus gigas* es actualmente la única especie de calamar que constituye una pesquería con un grado de desarrollo importante en el Pacífico Norte de México; aunque hay varias especies que se pescan en forma incidental como los géneros *Loligo*, *Lolliguncula*, *Loliolopsis*, *Illex*, *Ommastrephes* y *Symplectoteuthis*. La Gráfica 1 muestra el volumen de captura del calamar gigante en México, los principales estados productores son Sonora y Baja California Sur. A nivel nacional este recurso ocupó el sexto y décimo lugar de la producción pesquera nacional para 2004 y 2005 según reportes del Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca, SAGARPA (SIAP Anuario pesquero 2003-2005, <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>).



Gráfica 1. Producción del calamar gigante en México (Anuario estadístico de pesca 2003, 2004, 2005; datos preliminares para 2004 y 2005).

En los últimos años, la pesca de este molusco ha adquirido gran importancia en los litorales de las costas del Pacífico y en particular de Baja California. Además, el volumen de exportación de este recurso se encuentra dentro de los primeros diez productos pesqueros de mayor demanda (SEMARNAP, 2003); se ha identificado a Japón como el principal consumidor de este cefalópodo en el ámbito mundial, ya que utiliza el 31% de la producción total; siguiéndole otros países asiáticos como Corea, Taiwán, Hong Kong, con el 30% y algunos países del mediterráneo entre los que destacan Italia, Francia y Grecia, que junto con España, Portugal y Alemania el consumen el 15% de la producción mundial de éste cefalópodo (Anónimo, 1992; Anuario de Pesca, 2003). Actualmente el calamar se encuentra en el mercado en diferentes presentaciones, algunas de estas son:

- Fresco: el calamar se encuentra a la venta en distintas formas, con piel, sin piel, en filetes, por partes (tubos, mantos, alas, tentáculos).
- Calamar enlatado en conserva: calamar enlatado en diferentes medios de cobertura, principalmente aceite y salsa de tomate con diferentes ingredientes y aditivos, según el mercado al que se dirigen.
- Congelado: El calamar congelado se distribuye en el mercado entero o por partes, destacando: alas, tentáculos, tubos filetes sashimi, filetes “valencia” (CIBNOR, 2003).

La mayor parte del manto de calamar gigante se expende para el mercado nacional e internacional en forma de filete congelado, y en menor proporción como filete precocido, precongelado con sal, precocido con o sin sazonadores (Análisis de mercado, 2003; CIBNOR, 2003).

2.1.1 Exportaciones

Las exportaciones mexicanas de los moluscos en el bienio 2000-01, se situaron alrededor de las diez mil toneladas, equivalentes a once millones de dólares, aproximadamente. En 2002, las ventas externas ascendieron a 14,600 toneladas con un valor de 19.125 millones de dólares, lo anterior implica un crecimiento anual de 50.5% en volumen y 57.4%, en valor, respecto al 2001. Es importante destacar que más de la mitad de las exportaciones mexicanas de este tipo de productos se destina directamente a los mercados asiáticos, en particular a Corea, mientras que el restante es enviado a EUA y Canadá. En virtud de que no fue sino hasta enero del 2002 cuando en México se determinó explícitamente el comercio internacional del calamar en las fracciones 03074101 y 03074901, se realizaron estimaciones de las exportaciones de este producto para determinar la tendencia de las mismas, las cuales en general mostraron un comportamiento errático. No obstante, en 2002 se registra una tendencia creciente y muy favorable de las exportaciones de calamar tanto en valor como en volumen al registrar tasas de crecimiento significativamente altas. Las exportaciones del calamar, en términos generales, disminuyen considerablemente durante los meses de diciembre a marzo (invierno), mientras que en los meses de primavera-verano (abril a agosto), tienden a registrar los mayores incrementos (Análisis de mercado, 2003; CIBNOR, 2003).

El análisis de precios medios de exportación del calamar de México, indica que éste se ha mantenido alrededor de un dólar por kilogramo, llegando ocasionalmente a alcanzar la cotización de 1.5 dólares por kilogramo; excepcionalmente ha cotizado a valores considerablemente superiores.

Por otra parte, los precios al mayoreo del calamar en EUA muestran niveles que se sitúan en un intervalo de 1.50 a 3.00 dólares por kilogramo. Destaca el hecho de que en años anteriores, la cotización máxima del calamar se registraba en los meses de junio y septiembre. En los años 2000-2002, la cotización más alta del producto se alcanzó en abril, septiembre y diciembre (Análisis de mercado, 2003).

2.1.2 Importación del calamar en Asia

Los países asiáticos son los principales consumidores de moluscos de este tipo. Con base a disponibilidad de información (Corea, China, Japón y Taiwán), se estimó la demanda de calamar de estos países, los cuales muestran un importante crecimiento de marzo de 1999 a junio del 2001. No fue sino hasta el segundo semestre del 2002, cuando las importaciones de calamar de estos países mostraron una recuperación con tasas positivas del 10%, sin embargo, muestran una tendencia a la baja que se extendió durante 2003 (Análisis de mercado, 2003; CIBNOR, 2003).

2.1.3 Importación de calamar en EUA

Con respecto a EUA, las importaciones de calamar han mostrado una tendencia creciente (7.7% de crecimiento medio anual entre 1996 y 2002, en términos de valor y 9.7%, en términos de volumen). En 2002, las compras de este producto ascendieron a 46,758 toneladas por un monto equivalente a 98.9 millones de dólares, lo cuál representa un incremento de 22.1% en términos de valor con respecto al 2001 y de 8% en términos de volumen (Análisis de mercado, 2003).

2.2. COMPOSICION DEL TEJIDO MUSCULAR DEL CALAMAR

El manto del calamar está compuesto de tejido muscular intercalado entre dos túnicas de tejido conectivo. Las fibras musculares están agrupadas en bandas ordenadas de manera ortogonal, se clasifican en: (a) fibras circunferenciales que corren dentro del espesor del manto y (b) fibras radiales perpendiculares a ambas túnicas del tejido conectivo. Todas las fibras musculares son pequeñas células multinucleadas, cuyo citoplasma o sarcoplasma alberga a las miofibrillas, proteínas sarcoplásmicas y mitocondrias. Las fibras del manto del calamar están estriadas oblicuamente y cubiertas con un sarcolema delgado. Las fibras de tejido conectivo están arregladas en un modelo específico en la túnica exterior, que aparece menos ordenado en la túnica interna. Todas las fibras de tejido conectivo están compuestas de agregados de fibras pequeñas, pero el tamaño y forma difieren en cada túnica. En general, las fibras musculares no corren paralelamente a lo largo del eje del manto del calamar (Valiela y Wainwright, 1972; Preuss y col., 1997).

En la Figura 1, se muestra un esquema de las túnicas internas y externas, cubiertas por un revestimiento visceral no fibroso, y un revestimiento exterior de fibras orientadas al azar, respectivamente (Otwell y Hamann, 1979).

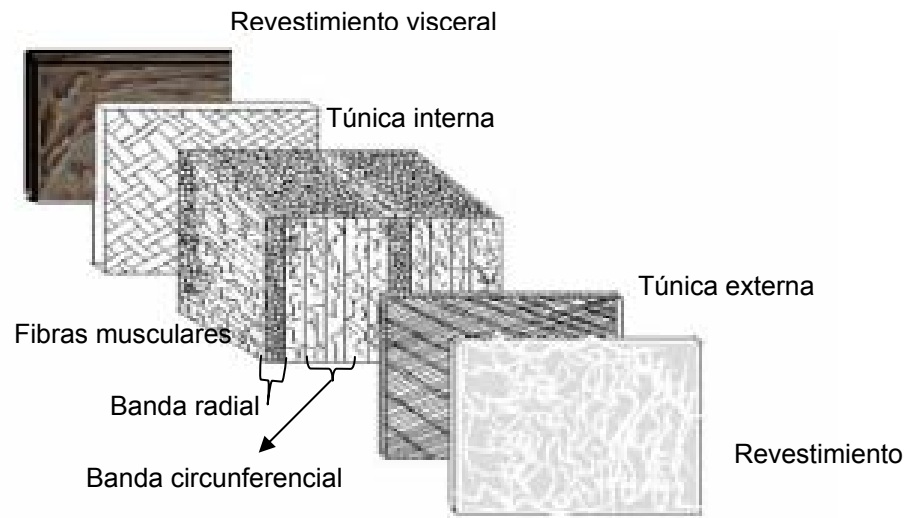


Figura 1. Representación esquemática del manto del calamar. Cubo ampliado del espesor completo del manto (Otwell y Hamann, 1979).

2.3. CLASIFICACION DE LAS PROTEINAS MUSCULARES

Las proteínas constituyen el componente mayoritario de la materia seca del músculo estriado, tienen un papel fundamental en la calidad sensorial y nutritiva de alimentos de origen muscular como carnes rojas, pescados y mariscos. Las proteínas presentes en el tejido muscular se clasifican en función de su localización y solubilidad en sarcoplásmicas, miofibrilares, e insolubles o del estroma (Cassens, 1994; Pérez y col., 2000).

2.3.1 *Proteínas miofibrilares*

Las proteínas contráctiles o miofibrilares son responsables de la contracción muscular, son solubles en disoluciones de alta fuerza iónica pero insolubles en agua.

En general las proteínas miofibrilares de organismos marinos son menos estables al calor que aquellas de animales terrestres aunque dependen de la temperatura del hábitat de cada especie. Niwa (1992), señaló que la miosina de peces adaptados a 10 °C es menos termoestable que aquella de carpa aclimatada a 30 °C. Asimismo, se ha determinado que la miosina de peces es más susceptible a la hidrólisis enzimática y puede ser digerida más rápidamente.

La miosina (470 kDa) y actina (43-49.8 kDa) son las principales proteínas contráctiles, representan el 50-60% y 15-30% de las proteínas miofibrilares, respectivamente. Otra proteína de importancia y que no se encuentra en animales terrestres es la paramiosina constituida por dos cadenas helicoidales, con un peso molecular entre 95 y 125 kDa. La concentración de esta proteína es variable, 3% en la fracción miofibrilar de ostras y 14% en calamar. La paramiosina tiene una función estructural, estabiliza la orientación de la miosina y se encuentra en los centros de los filamentos gruesos de los músculos de invertebrados. Debido a la presencia de esta proteína los geles de invertebrados son más elásticos y cohesivos que los geles obtenidos a partir de pescado (Kantha y col., 1990).

2.3.2 Proteínas solubles o sarcoplásmicas

Los compuestos presentes en el sarcoplasma o miógeno de organismos de origen marino incluyen proteínas solubles en agua y en disoluciones salinas diluidas, péptidos, aminoácidos, aminos, guanidina purinas y urea. Todos ellos tienen un papel fundamental en la regulación del metabolismo celular, directamente en la catálisis enzimática, osmoregulación y transporte celular. Además son directa o

indirectamente responsables de las características sensoriales como aroma, sabor y textura tanto del tejido fresco como de los productos procesados (Ochiai y Chow 2000).

Las proteínas sarcoplásmicas representan el 25% de la proteína total e incluyen a la mioglobina, sistemas enzimáticos y albúmina, entre otros. A diferencia de los animales terrestres, los organismos marinos también contienen paralbúmina (12kDa, forma complejos termoestables con iones Ca^{2+}). Por otra parte la concentración de proteínas sarcoplásmicas es mayor en peces pelágicos como la sardina y la macarela; y menor en demersales (Sikorski, 1994; Sikorski y col., 1994).

2.3.3 Proteínas insolubles

La fracción insoluble incluye a las proteínas del tejido conectivo, a las proteínas de las membranas y proteínas contráctiles insolubles como la desmina y conectina. El colágeno comprende una familia de moléculas relacionadas, es el principal componente del tejido conectivo y se han aislado por lo menos 14 tipos de colágeno. El colágeno tipo VI, se encuentra en la matriz extracelular del sistema vascular, cartílago y córneas, mientras que los tipos VII, IX y XII se localizan en el epitelio, arterias y cartílago (Hultin, 1993).

El contenido de colágeno y la formación de enlaces cruzados influyen en la solubilidad y dureza del tejido muscular. En animales terrestres el número de enlaces cruzados aumenta con la edad resultando en un incremento en la dureza de la carne. Por el contrario, en peces como el bacalao, la concentración de colágeno soluble aumenta con la edad; aunque, en general los organismos marinos contienen

alrededor de una décima parte del colágeno que contienen mamíferos y aves. (Montero y Borderías, 1999).

2.4. FUNCIONALIDAD DE LAS PROTEINAS MUSCULARES

Se ha establecido que la funcionalidad de los tejidos musculares depende de la fracción proteica; ya que los cambios suscitados a nivel molecular modifican las características microestructurales y reológicas del tejido muscular (Sikorski, 1994). Las propiedades funcionales de las proteínas desempeñan un papel importante en la fabricación y en los atributos de calidad del alimento. Se dividen en propiedades de hidratación, propiedades de superficie y propiedades basadas en la interacción proteína-proteína (Flores y Bermell, 1984). Las proteínas miofibrilares son las principales contribuyentes de la textura y de las propiedades funcionales en el músculo; pero son también las más afectadas durante el almacenamiento (Careche y col., 1999). La relación entre propiedades funcionales y características estructurales se estudia con el fin de explicar la variación en el comportamiento funcional de los miosistemas o sistemas cárnicos modelo (Carballo y López, 2001).

2.4.1 Gelificación

Las características típicas de muchos alimentos están determinadas por la gelificación de las proteínas que ocurre al aplicar un tratamiento térmico. Aunque, en algunos casos la gelificación se presenta como resultado de una hidrólisis enzimática moderada, por adición de iones divalentes como el Ca^{2+} , o por la aplicación de tratamientos de altas presiones, entre otros (Pilosof, 2000a).

Los geles exhiben propiedades microestructurales y mecánicas diversas; de acuerdo a Clark (1991), un gel es un material formado por una red tridimensional sólida y continua, que embebe e inmoviliza al disolvente. Las proteínas se polimerizan formando una red tridimensional semi-sólida, en donde la suspensión inicial se transforma en una matriz viscoelástica. Sin embargo, los geles pueden fracturarse y fluir bajo la aplicación de fuerzas pequeñas (Pilosof, 2000a). El proceso de gelificación no debe confundirse con los fenómenos de coagulación y floculación, ya que a diferencia de ellos, la gelificación es una asociación ordenada (no al azar) de proteínas formando una red proteica ordenada (Pilosof, 2000a). Desde el punto de vista microestructural se pueden encontrar varios tipos de geles proteicos: (a) geles formados por una red de filamentos finos, y (b) geles agregados. Los primeros están formados por una asociación ordenada de moléculas de proteína y el grosor de los filamentos es muy pequeño por lo que estos geles son transparentes (Pilosof, 2000a). La formación de geles agregados ocurre a pHs cercanos a su punto isoeléctrico, por desnaturalización parcial de la proteína o por la presencia de sales. Los geles agregados son opacos y tienen menor capacidad de retención de agua (Pilosof, 2000a).

2.4.2 Gelificación de proteínas globulares por calor

La gelificación se inicia con la desnaturalización térmica y posterior polimerización de las moléculas de proteína, que conduce a la formación de una red tridimensional de proteína fibrosa (Hickson y col., 1982).

La agregación y desplegamiento inducido por el calor en las proteínas musculares genera una matriz con ciertas propiedades de textura y capacidad de retención de agua, dependiendo de factores como la cantidad de proteína extraíble, la solubilidad proteica, las estructuras isomórficas de proteína, el pH y la fuerza iónica. La funcionalidad de la carne deriva de cada uno de los parámetros anteriores y de la interacción entre estos (Foegeding y col., 1986).

Las proteínas solubles en disoluciones salinas (pss) son los principales componentes del tejido muscular esquelético responsables de la formación de geles y de la funcionalidad del miosistema (Nucles y col., 1991). Los geles presentan un máximo de fuerza y firmeza a un pH de 6.0, ya que diferentes valores de pH inducen variaciones en la estructura isomórficas de las proteínas miofibrilares, afectando la estructura del gel y su dureza, además de variaciones en las propiedades de gelificación de los sistemas miofibrilares derivados de los diferentes músculos (Xiong, 1994). Aunque es común la adición de enzimas como la transglutaminasa (TGasa) para mejorar las propiedades de gelificación (Sakamoto y col., 1995). La TGasa es una transferasa, que tiene el nombre sistemático de proteín-glutamin γ -glutamyltransferasa (EC 2.3.2.13.) que cataliza la reacción de transferencia de un acilo entre los grupos γ -carboxiamida pertenecientes a los residuos de glutamina de las proteínas, péptidos y varias aminas primarias. Cuando el grupo ϵ -amino de la lisina actúa como un aceptor del acilo, es en el momento en que se da la polimerización ya sea por enlaces inter- o intra- moleculares de las proteínas, vía la formación de enlaces ϵ - (γ -glutamil) lisina. Este hecho se explica a través de un intercambio del grupo ϵ -amino de la lisina por amoniaco en el grupo carboxiamida de

la glutamina. En la ausencia de aminos primarias, el agua puede actuar como un aceptor del acilo, dando como resultado la desaminación de los grupos γ -carboxiamida de la glutamina, formando así ácido glutámico. La formación de enlaces covalentes entre las proteínas es la base en la que se fundamenta la habilidad de la TGasa para modificar las propiedades físicas de las proteínas musculares (Ashie y Lanier 2000).

Dado que los geles son sistemas de multi-componentes, el modelo clásico de dos estados no es correcto para algunas proteínas con multidomios, como por ejemplo, el colágeno, la miosina, la tropomiosina y troponina (Nucles y col., 1991).

Después del tratamiento térmico, un complejo proteico como la miosina sufre múltiples cambios conformacionales debido a las diferentes etapas de estabilización térmica dentro de cada dominio estructural. Consecuentemente, las redes proteicas pueden producir diferentes estructuras y texturas y por tanto, diferentes grados de rigidez en el gel. El proceso de desdoblamiento debe ocurrir primero, para desarrollar un gel con un alto grado de elasticidad, mientras que la agregación debe proceder más lentamente que el paso de desplegamiento con el fin de permitir la desnaturalización de las moléculas proteicas y la orientación sobre sí mismas formando una red tridimensional estructurada (Xiong, 1994). Factores como el pH y la fuerza iónica contribuyen a la desnaturalización y la velocidad de gelificación, por lo que gran parte de la naturaleza reológica del gel está determinada por éstos factores (Hickson y col., 1982).

2.4.3 Gelificación de proteínas miofibrilares

La esencia del proceso de gelificación, es sin duda el punto gel, es decir, el punto donde ocurre la transformación de líquido a sólido (Pilosof, 2000b).

La formación de un gel puede describirse como un fenómeno de agregación en el cual las fuerzas atractivas y repulsivas se encuentran balanceadas para formar una red tridimensional capaz de retener gran cantidad de agua. Si las fuerzas atractivas predominan se forma un coágulo, en donde la red es desordenada y el agua no es retenida (Matsumura y Mori, 1996). La gelificación inducida por calor puede ser definida como un proceso de dos etapas que involucra el desplegamiento de la molécula proteica, seguido por la agregación de las proteínas para formar una red (Ziegler y Acton, 1984; Smith, 1994; Matsumura y Mori, 1996). Este modelo de gelificación es válido para proteínas con dominios simples, como la ovoalbúmina, α -lactoalbúmina, lisozima o ρ -lactoglobulina (Smith, 1994). En las proteínas cárnicas, la miosina es la molécula proteica responsable de la mayor parte de las propiedades de gelificación. Esta proteína contiene dominios múltiples (entendiéndose por dominios estructurales las regiones, de aproximadamente 200 aminoácidos, que pueden considerarse como independientes una de otras) capaces de desplegarse independientemente aún dentro de la misma molécula (Smith, 1994). Mediante calorimetría diferencial de barrido se ha determinado la existencia de 10 dominios estructurales en la molécula de miosina (Smyth y col., 1996; Vega-Warner y Smith, 2001). La molécula de actina, por su parte, no es capaz de formar una red tridimensional al ser sometida a un tratamiento térmico. No obstante, en presencia de miosina se presenta un efecto sinérgico y de complementación; una buena relación

miosina-actina es esencial para el desarrollo de un gel rígido (Sano y col., 1989; Barbut, 1994; Boyer y col., 1996). Los geles obtenidos únicamente a partir de miosina muestran los mayores valores de rigidez, mientras que geles elaborados con miosina adicionados con pequeñas cantidades de actina presentan una elevada elasticidad (Sano y col., 1989). La tropomiosina y la troponina, por el contrario, no presentan un papel activo en la gelificación inducida por calor de la actomiosina (Ziegler y Acton, 1984; Jiménez-Colmenero y col., 1994; Lan y col., 1995a). La capacidad para formar geles es mayor para la miosina intacta, seguida a continuación por la porción de la cola de la molécula y finalmente por las cabezas globulares (Samejima y col., 1981). Las cadenas pesadas de la miosina son las responsables de la gelificación inducida por calor en dicha proteína (Sano y col., 1990a).

Las cadenas ligeras de la miosina influyen sobre la estabilidad térmica y el perfil de agregación de la miosina (Sano y col., 1990a; Sano y col., 1990b; Chan y col., 1993; Smyth y col., 1996). El desarrollo de la desnaturalización de la miosina es muy complejo, cada transición térmica está asociada con una región discreta de la molécula. Por ello, dicho desarrollo depende de la estabilidad térmica intrínseca de cada región: la porción de la cola de la miosina es el principal subfragmento asociado con la gelificación, la meromiosina ligera y el subfragmento S1 son los responsables de la desnaturalización y agregación térmica a temperaturas por debajo de 55 °C; el subfragmento S2 se desnaturaliza y agrega encima de dicha temperatura (Sano y col., 1990a; Sano y col., 1990b; Chan y col., 1993; Tazawa y col., 2002). Los enlaces S-S en la región S1 de la molécula de miosina contribuye a la formación de una

matriz tridimensional en un intervalo de temperaturas de 45-55 °C (Samejima y col., 1981), debido posiblemente a que la cabeza globular posee 12 o 13 de los 42 grupos tiol (-SH) presentes en la molécula de miosina (Smyth y col., 1998). Arriba de los 55 °C, los enlaces disulfuro son menos importantes para la gelificación de la miosina. La cola de la miosina (meromiosina ligera y S2) es posiblemente la responsable de la formación del gel a dichas temperaturas, vía la formación de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (Smyth y col., 1998; Visessanguan y An, 2000). La estructura intacta de la miosina permite que cada dominio estructural se despliegue paso por paso y refleje la naturaleza cooperativa de la transición. Las propiedades de gelificación de la miosina están altamente correlacionadas con la longitud de la porción de α -hélice de la molécula (Visessanguan y An 2000).

La gelificación de proteínas miofibrilares es pH dependiente, observándose mayor fuerza de gel a pH de 6-6.5 (Ishiroshi y col., 1979; Samejima y col., 1981; Ziegler y Acton, 1984; Flores y Bermell, 1986; Xiong, 1992; Lan y col., 1995b). El efecto del pH sobre la rigidez de estos geles, puede atribuirse a las modificaciones en la asociación proteína-proteína, resultado del balance de fuerzas electrostáticas y de otras uniones. La contribución de estas interacciones para cada molécula proteica depende del grado de desdoblamiento, el cual también está afectado por el pH (Xiong, 1992). Samejima y col. (1985) indican que la rigidez del gel es proporcional a la solubilidad proteica, aunque otros autores (Xiong, 1992; Liu y Xiong, 1997) no consideran a la solubilidad como el único parámetro de importancia. Bajas tasas de calentamiento permiten un mayor tiempo para que las proteínas se desplieguen, interactúen entre ellas y establezcan una matriz más rígida (Camou y col, 1989;

Barbut y Mittal, 1990). Altas tasas de calentamiento posiblemente favorezcan una rápida asociación de las moléculas proteicas, como resultado las interacciones proteína-proteína ocurren en una forma menos ordenada, favoreciéndose los procesos de nucleación y crecimiento (Foegeding y col., 1986; Jiménez-Colmenero y col., 1994; Lefevre y col., 1998).

2.4.4 Caracterización de los geles

Los geles pueden ser caracterizados desde el punto de vista macroestructural o microestructural. La evaluación macroestructural involucra la evaluación de propiedades físicas y químicas del sistema como un todo. La caracterización molecular del sistema, evalúa las propiedades relacionadas a las transformaciones moleculares que ocurren durante la formación del gel. Entre la evaluación macroestructural y la molecular, se puede definir una región que se puede llamar “microestructural”. Esta evaluación involucra el seguimiento de reacciones y de cambios físicos que no pueden ser observados directamente. En la tabla 1 se muestra la clasificación para la caracterización de geles.

Tabla 1. Caracterización de geles

Caracterización Macroestructural	Caracterización Microestructural
Viscoelasticidad	Microscopía electrónica de barrido (MEB)
Textura	Microscopía electrónica de transmisión
Propiedades de flujo	Microscopía óptica
Retención de agua	Calorimetría diferencial de barrido

(Pilosoph, 2000a)

2.4.4.1 Viscoelasticidad

Los materiales viscoelásticos como los geles se caracterizan principalmente mediante dos formas de medición: métodos dinámicos (oscilatorios) y métodos transientes (estudios de “creep” y relajación de esfuerzo).

2.4.4.2 Medidas dinámicas

Se utilizan reómetros oscilatorios de amplitud de deformación pequeña. El barrido de deformación se usa para determinar los límites del comportamiento viscoelástico lineal; en la región lineal las propiedades reológicas no son dependientes de la deformación. El barrido de frecuencias muestra la manera en que el comportamiento elástico y viscoso del material cambia con la velocidad de aplicación de la deformación. Los estudios dinámicos permiten determinar propiedades de los materiales: módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G''), viscosidad compleja (η^*), viscosidad dinámica (η' y η''). El espectro mecánico de un gel, es decir la variación del módulo de almacenamiento (G') y pérdida (G'') en función de la frecuencia se diferencia del espectro de un fluido viscoelástico y permite definir un gel según un criterio reológico. Si bien la apariencia de un gel puede fluctuar desde un sólido blando que no se auto soporta a un material con características de sólido, la caracterización reológica debe responder al siguiente patrón: el módulo G' es considerablemente mayor que G'' (predomina el carácter elástico), y ambos deben ser independientes de la frecuencia en un intervalo amplio de frecuencias (Almadal y col., 1993).

2.5. ENZIMAS PROTEOLITICAS PRESENTES EN EL TEJIDO MUSCULAR

Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferente grado de intensidad y de selectividad. Las proteasas son clasificadas de acuerdo a su origen, que puede ser: vegetal (papaína, ficina y bromelina), animal (catepsina, tripsina y quimotripsina), y microbiológico (subtilina) (Quirasco y López-Munguía, 2006). También son clasificadas de acuerdo a su acción catalítica como endopeptidasas o exopeptidasas, y también de acuerdo a la naturaleza de su sitio catalítico.

El tejido muscular contiene diversos tipos de proteasas; asimismo, las propiedades fisicoquímicas y catalíticas de una enzima de una especie dada, pueden variar con la edad biológica, dieta, actividad, temperatura del hábitat, entre otros factores (Carballo y López, 2001).

El manejo antes del sacrificio y en la etapa *postmortem*, tiene un efecto determinante en la actividad de las enzimas endógenas que actúan en la etapa *postmortem*.

La actividad de las proteasas en el músculo de productos marinos es variada y depende de la localización en el músculo, el ciclo de vida, la presencia de activadores e inhibidores endógenos, pH y temperatura. Las proteasas neutras y alcalinas tienen mayor impacto sobre el deterioro *postmortem* en la calidad del músculo del pescado, que las catepsinas activas a pH ácido. La pérdida de calidad es causada por degradación enzimática de la colágena en el tejido crudo, y por las enzimas activadas por calor en geles de pescado (Kolodziejska y col., 1994a).

Cuando el calamar muere entra en un estado incontrolable de degradación proteica ocasionado por proteasas endógenas y bacterianas (Eileen y Gill, 1982); por lo cual es posible que las proteasas endógenas que se encuentran en esta especie sean las principales causantes de esta autólisis, y del subsecuente decaimiento de la textura durante el almacen, cocción o procesamiento (Ebina y col., 1995). Existen distintas teorías sobre si el ablandamiento *in vitro* de la carne es debido a la acción de proteasas endógenas o a la de microorganismos (Eileen y Gill, 1982). Las proteasas endógenas del músculo se incluyen en dos grupos, las dependientes de Ca^{2+} (PDC) llamadas calpainas, y las lisosomales llamadas catepsinas (Carballo y López, 2001).

Debido a que el calamar es una especie con un alto valor proteico, éste contiene grandes cantidades de enzimas proteolíticas (Eileen y Gill, 1982). Se han identificado las catepsinas B, P y E y una cisteín-proteínasa ácida, en el tejido muscular de *Ommanastrephes sloani*, así como metaloproteasas neutras de algunas especies como *Teuthoidea* y proteasas alcalinas de *Loligo forbesi* (Ebina y col., 1995). Hameed y Haard (1985) reportaron que el extracto del manto del calamar de la especie *Illex illecebrosus*, contiene una enzima clorada activa la cual cataliza reacciones características de la catepsina C.

También se han aislado y caracterizado la catepsina C del hígado y páncreas del calamar *Illex illecebrosus* y la catepsina D de la panza del calamar *Todarodes sagittatus* (Kolodziejska y col., 1994a).

Ashie y col. (1996) mencionan que en el músculo de la carpa el pH óptimo para la actividad de catepsina D está alrededor de 3 a 4.5, asimismo las catepsinas A y D no presentan actividad proteolítica a pH por arriba de 6.

2.5.1 Acción de proteasas sobre la estructura miofibrilar

A continuación se explica brevemente el efecto de las proteasas sobre la estructura miofibrilar de las carnes rojas. Si bien no se tiene mucha información sobre este tema en productos marinos, se cree que los mecanismos de degradación de la estructura miofibrilar son similares en ambos tipos de músculo.

2.5.2 Efecto de las calpainas sobre la estructura miofibrilar

Se ha establecido que la mayor dificultad para determinar la acción de las calpainas en vivo es la identificación de sus sustratos fisiológicos; sin embargo, se acepta generalmente que el ablandamiento de la carne durante la maduración se debe a la proteólisis de las proteínas miofibrilares, en particular de la troponina T y la desmina (Etherington, 1984). Se supone que la pérdida de estos componentes particulares puede ser directamente responsable del rompimiento de la fibra muscular (Pérez y Guerrero, 1999).

2.5.3 Efecto sobre miosina y actina

Algunos autores han reportado que la incubación de miofibrillas a 25 °C con calpainas no produce rompimiento de miosina y actina (Whipple y Koochmaraie, 1991; Greaser y Fritz, 1995). Esta determinación sugiere que las calpainas no están involucradas en este proceso y la degradación de miosina se ha atribuido a la proteólisis por catepsina D (Alarcón y Dransfield, 1990).

2.6. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO DE PRODUCTOS MARINOS EN CONGELACION

El problema común en los peces y mariscos durante su procesamiento y almacenamiento es la pérdida de textura, la cual está relacionada con una elevada actividad proteolítica y con reacciones de desnaturalización y agregación (Okamoto y col., 1993; Ashie y col., 1996; Wako y col., 1996; Ashie y Simpson, 1997), además de otras reacciones como la degradación del óxido de trimetilamina y producción de formaldehído (Hultin, 1993; Lindsay, 1993). A pesar de que el calamar es un producto rico en proteínas, tiene una vida de anaquel reducida, baja capacidad de retención de agua y muy pobre formación de geles, debido a la rápida degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento (Nagashima y col., 1992; Gómez y col., 1996b). Algunas de las proteasas implicadas en este proceso son las catepsinas, calpainas, enzimas digestivas y otras proteasas musculares (Ashie y Simpson, 1997, Ashie y col., 1996). Se ha reportado para varias especies de

calamar, una actividad proteolítica muy alta, la cual está asociada a diversos factores como la velocidad de crecimiento y época del año (López, 1984; Paredi y Crupkin, 1997). Durante el almacenamiento en congelación el músculo se puede tornar duro o elástico, con características chiclosas, acompañado por la pérdida en las propiedades funcionales, principalmente solubilidad, capacidad de retención de agua, capacidad de gelificación, capacidad de emulsificación, entre otras (Sikorski y Kolakowska, 1994b; Barroso y col., 1998).

2.6.1 Consecuencias de la velocidad de congelación

La velocidad de congelación y la temperatura de almacenamiento afectan el tamaño y la distribución de cristales de hielo en el tejido muscular y pueden cambiar la microestructura del músculo (Sikorski y Kolakowska, 1994a), ya que una congelación lenta causa la formación de cristales inter e intracelulares, los cuales provocan la ruptura de membranas y desorden ultraestructural del tejido (Shenouda, 1989). Estas modificaciones son menores cuando la congelación es rápida y la temperatura de almacenamiento es controlada. El almacenamiento en congelación provoca la desnaturalización y agregación de las proteínas, resultado de la concentración de sales cada vez mayor en el agua residual no congelada, y a la acción deshidratante que estas sales ejercen en las células. La elevada fuerza iónica del agua de la fase residual no congelada, favorece la formación de enlaces disulfuro y enlaces no covalentes a nivel de la actomiosina de tal forma que las miofibrillas se adhieren fuertemente entre sí. Como consecuencia disminuye la capacidad de retención de agua y la extractibilidad de actomiosina, aunado a un fuerte exudado

que conlleva a la pérdida de aminoácidos, vitaminas y sales minerales, entre otros (Shenouda, 1989).

El aumento de la concentración de sales, y el concomitante cambio del pH, pueden causar una extensa desnaturalización de las proteínas del músculo. Si la exposición a concentraciones salinas elevadas y pHs desfavorables ocurren a temperaturas por debajo del punto de congelación, se puede acelerar el proceso de desnaturalización con el consiguiente descenso de la capacidad de retención de agua del tejido. Esta pérdida de la capacidad de retención de agua de las proteínas, junto con el daño mecánico que los cristales de hielo ejercen sobre las células es responsable en gran parte del exudado de descongelación (Hultin, 1993).

Además, la velocidad a la cual se congela el músculo de pescado influye en el grado de desnaturalización proteica. Aunque la congelación rápida se traduce, en general, por una desnaturalización menos acusada que la producida por la congelación lenta, las velocidades de congelación intermedias pueden ser menos beneficiosas que la congelación lenta, a juzgar por los cambios texturales y la solubilidad de la actomiosina. Los filetes de bacalao congelados a velocidades intermedias, muestran cristales de hielo intercelulares lo suficientemente grandes como para lesionar las membranas celulares (Hultin, 1993).

Generalmente las enzimas no son inactivadas por los procesos de congelación y algunas continúan funcionando en el tejido animal congelado. Las enzimas con energías de activación bajas, conservan una considerable actividad en estado congelado, con frecuencia más alta de lo que sería de esperar por extrapolación de las curvas de Arrhenius para temperaturas superiores a las de

congelación. El daño por congelación de los tejidos debidos a deslocalización enzimática, los cambios de las condiciones ambientales (pH, fuerza iónica y concentración de sustrato), y de la constante de Michaelis, pueden explicar la retención de una elevada actividad enzimática, que a veces supera a la del tejido sin congelar (Hultin, 1993).

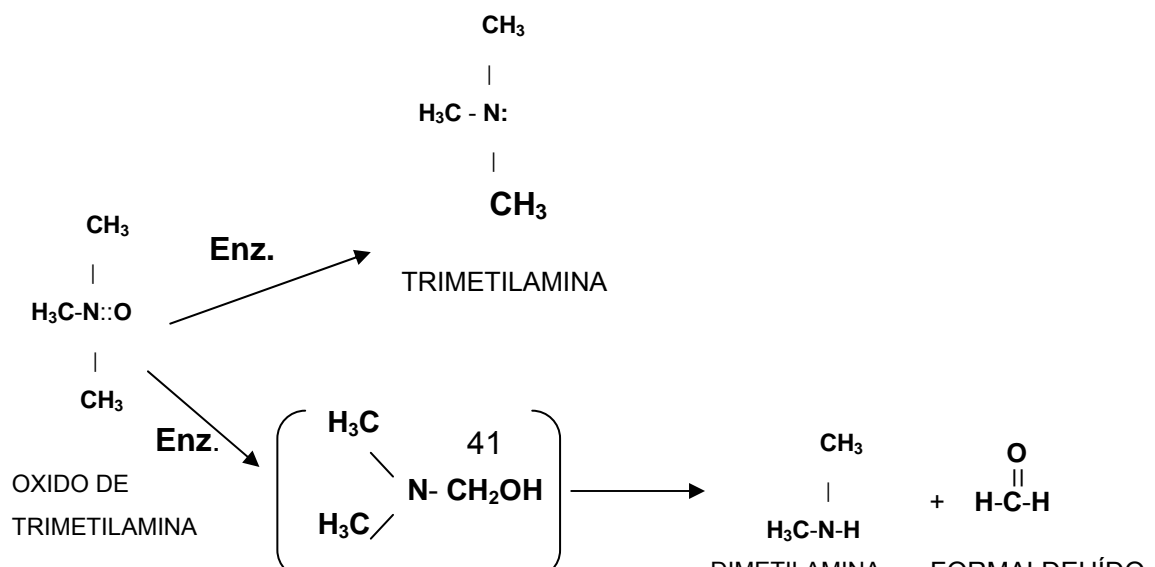
La congelación da como resultado la deslocalización de ciertas enzimas tisulares. La localización e identificación de las isoenzimas mitocondriales de la glutamato-oxalacetato transaminasa se ha utilizado para diferenciar la carne congelada y descongelada de vacuno, cerdo y pollo de los productos homólogos no congelados. La congelación y descongelación también puede liberar la citocromo oxidasa de las mitocondrias del músculo. La actividad de esta enzima es 2.5 veces más alta en el músculo de trucha congelada, que en las muestras sin congelar (Barbagli y Crescenzi, 1981).

Las principales enzimas que participan en la alteración de los tejidos animales durante la conservación en congelación a largo plazo, son las mismas que actúan sobre los tejidos. Las lipasas y fosfolipasas liberan ácidos grasos que pueden oxidarse fácilmente (Shewfelt y Hultin, 1983). Los radicales libres formados por oxidación de ácidos grasos pueden reaccionar con proteínas reduciendo su solubilidad. En la fracción aislada de la membrana microsomal del músculo esquelético de pescado, la oxidación de los lípidos se produce aún a temperaturas de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; sin embargo, la cantidad de ácidos grasos presentes en el calamar es muy baja, por lo cual este tipo de reacciones se presentan en menor grado que en otras especies marinas (Hultin, 1993).

Los productos marinos pueden sufrir marcados cambios de textura durante su almacenamiento en congelación, debido a la sensibilidad proteica y a los factores de desnaturalización activos durante el almacenamiento en congelación. La tropomiosina es la proteína más estable, seguida por la actina; mientras que la miosina es la proteína de menor estabilidad frente a la congelación (Hultin, 1993).

2.6.2 Reacciones secundarias durante el almacenamiento

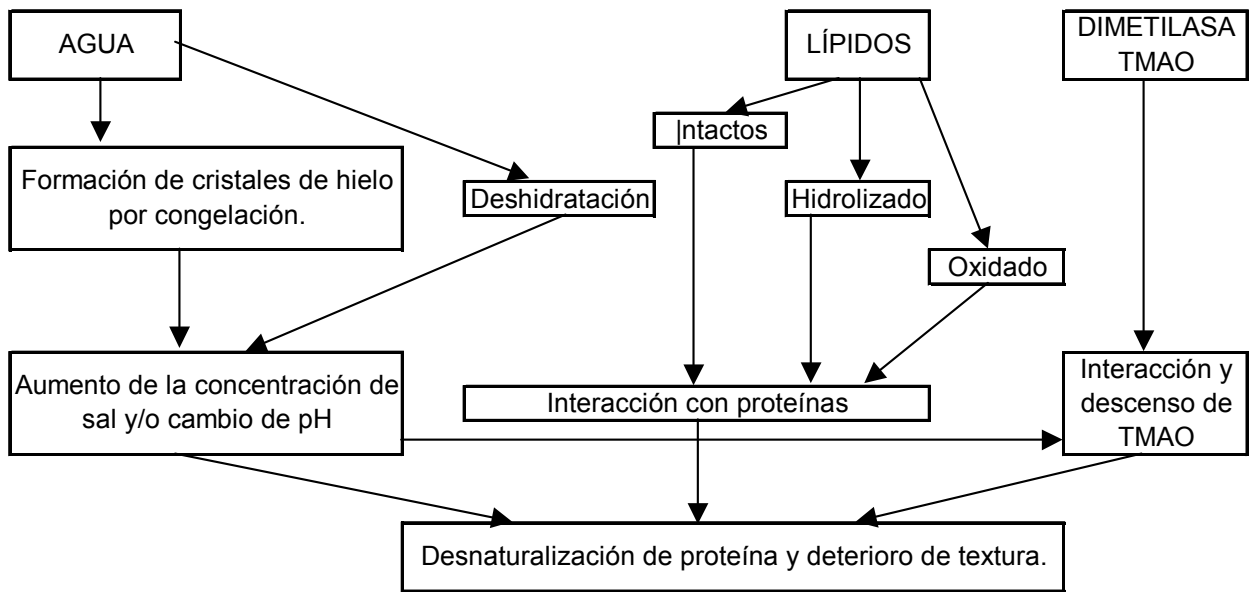
Un problema peculiar de las especies marinas es la degradación del óxido de trimetilamina por enzimas endógenas, formando dimetilamina y formaldehído. Se ha sugerido que el formaldehído genera enlaces cruzados con las proteínas del músculo, insolubilizándolas y provocando el endurecimiento. También se ha sugerido que la desnaturalización contribuye a la formación de nuevos enlaces disulfuro. La trimetilamina y la dimetilamina se producen mediante la degradación enzimática y/o química del óxido de trimetilamina, que se encuentra en cantidades significativas únicamente en especies de agua salada. El óxido de trimetilamina forma parte del sistema tampón de las especies marinas (Herbard y col., 1982). El formaldehído que se produce junto con la dimetilamina (Figura 2), contribuye al endurecimiento del músculo durante el almacenamiento y congelación (Lindsay, 1993).



(Lindsay, 1993).

Figura 2. Degradación enzimática de OTMA y formación de DMA y FA

En resumen los cambios que sufre el agua, lípidos y TMAO pueden inducir desnaturalización de proteínas. La Figura 3, muestra un esquema integrado de algunas reacciones responsables de la desnaturalización de las proteínas de los productos marinos y el endurecimiento del músculo (Lindsay, 1993; Hultin,1993).



(Hultin, 1993; Shenouda, 1989).

Figura 3. Algunos factores que influyen sobre la desnaturalización de las proteínas de productos marinos, durante el almacenamiento en congelación

Justificación

3. JUSTIFICACION

Varios autores han señalado que de los tres tipos de proteínas presentes en el músculo, la proteólisis de las fracciones miofibrilares, es la de mayor importancia en el proceso de conservación y procesamiento de productos marinos. Sin embargo, en estudios previos se ha determinado que una pérdida de la estructura proteica puede estar relacionada con la reducción de la capacidad funcional del sustrato.

Durante el almacenamiento en refrigeración y congelación de los productos marinos, existen cambios significativos a nivel estructural, afectando de esta manera la textura y calidad de las diferentes especies. En las especies marinas la velocidad de degradación es más elevada que la de otros tipos de tejido muscular, dentro de estos productos, el calamar gigante especie de importancia económica en México, es un producto poco estudiado. Se reconoce la presencia de cambios estructurales durante el almacenamiento de productos marinos en refrigeración y congelación; sin embargo, no se tiene información específica sobre el deterioro que sufre el calamar gigante. Una gran parte de la captura del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es exportado a otros países donde se aprovechan los beneficios tecnológicos, y alimenticios de esta especie; dado que la distribución y comercialización de este producto en su mayoría se lleva a cabo en refrigeración o congelación es necesario disponer de las condiciones adecuadas de almacenamiento, ya que de esto dependerá conservación de las propiedades de este producto. Por lo anterior, es necesario realizar un estudio sobre el efecto que tiene el almacenamiento en refrigeración y congelación con respecto a las proteínas miofibrilares, que son las responsables de la textura y de las propiedades funcionales, tales como capacidad

de retención de agua, solubilidad de proteínas y gelificación, entre otros. Por lo cual, el objetivo de este trabajo es el obtener conocimiento básico referente a los cambios fisicoquímicos y estructurales que se presentan durante el almacenamiento en refrigeración y congelación de este producto poco estudiado, recomendando de esta manera la mejor condición de almacenamiento para prolongar la vida de anaquel del mismo.

Hipótesis

4. HIPÓTESIS

Se sabe que el el tejido muscular del manto del calamar gigante se deteriora rápidamente tanto en refrigeración como en congelación, por lo que el estudio integral de los cambios estructurales y fisicoquímicos que sufre este producto tanto en refrigeración como en congelación permitirá identificar los mecanismos responsables de su rápido deterioro a fin de proponer alternativas para definir condiciones de almacén y un mejor aprovechamiento de este recurso.

Si el calamar es almacenado en forma adecuada éste presentará un menor deterioro, se espera que a menor temperatura la actividad proteolítica así como reacciones de agregación y desnaturalización de proteínas sean menores, por lo que el producto conservara sus características fisicoquímicas y estructurales.

Objetivos

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Estudiar el efecto del almacenamiento, en refrigeración y congelación, sobre la funcionalidad y estructura del tejido muscular del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

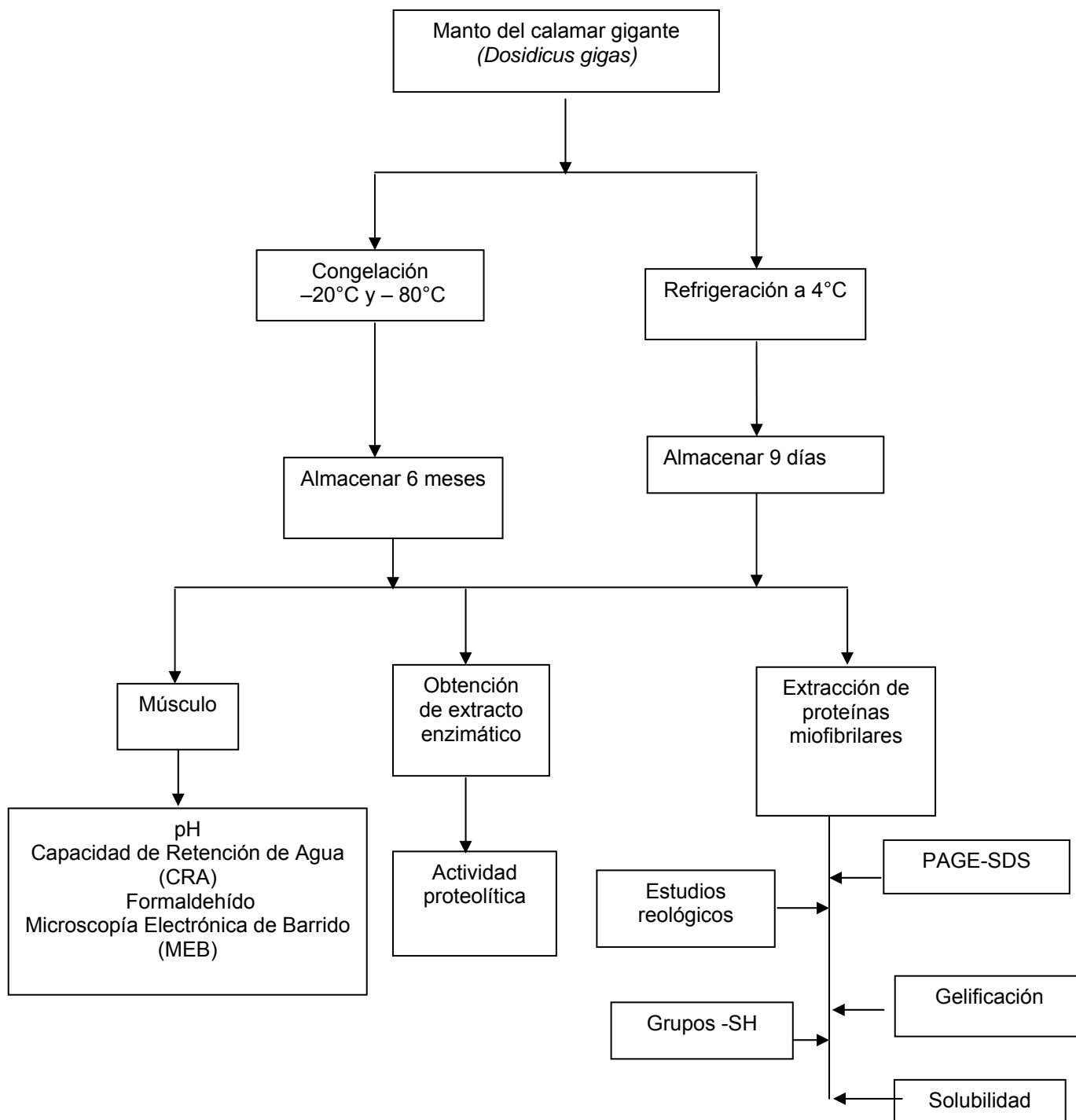
5.2. Objetivos particulares

- Evaluar los cambios en el pH y actividad de las proteasas endógenas en el calamar almacenado en refrigeración y congelación.
- Observar los cambios estructurales del manto del calamar durante el almacenamiento en refrigeración y congelación, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).
- Medir las alteraciones a nivel molecular por efecto de las variaciones en: pH, solubilidad, grupos sulfhidrilos y formaldehído durante el almacenamiento en refrigeración y congelación.
- Determinar los cambios en la funcionalidad de las proteínas musculares del calamar almacenado en refrigeración y congelación: capacidad de retención de agua, solubilidad, propiedades de gelificación y reológicas.
- Determinar el efecto de la degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento en refrigeración y congelación y proponer una alternativa en las condiciones de almacenamiento de este recurso.

Metodología

6. METODOLOGIA

6.1. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



6.2. Preparación de muestras

Especímenes de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) cuyo manto presento un peso promedio de 5.5 kg cada uno, fueron adquiridos en la Central de Abastos de la Nueva Viga, México D.F. Los animales fueron capturados en un periodo de 18-20 hr antes del muestreo, eviscerados y transportadas a la Ciudad de México en hielo bajo condiciones comerciales. Las muestras del manto de calamar se dividieron en tres lotes de 5 kg cada uno. Todas las muestras se empacaron al vacío en bolsas de polietileno. Dos lotes se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y fueron almacenadas por un periodo de 6 meses a -20 y -80 °C, tomando muestras cada cuatro semanas para su análisis. El tercer lote se almacenó en refrigeración a 4°C, por un periodo de 9 días, analizando las muestras cada dos días.

6.3 Reactivos

Azul de Coomasie R-250, N,N,N-tetra-metil etilen diamina (TEMED), 2- β -mercaptoetanol, 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico y hemoglobina fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis MO, USA). Acrilamida, Tris-HCl, persulfato de amonio, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerina y estándares de peso molecular fueron de Bio-Rad Laboratories Ltd (Ontario, Canada). Caseína calidad Hammarsten fue de Research Organics Inc. (Cleveland, OH, USA). El cloruro de sodio, ácido fosfórico, ácido acético, ácido tricloroacético (TCA), metanol y amortiguadores de sodio y potasio fueron de J.T. Baker (México, México).

6.4 Actividad proteolítica endógena del manto del calamar

Para obtener el extracto enzimático del manto de calamar, éste se homogenizó en una proporción 1:1(p/v) con una disolución amortiguadora de fosfatos (20 mM, pH 7, con NaCl al 0.9%). El homogenizado se centrifugó a 11000 rpm durante 20 min a 4 °C (Centrifuga Beckman J2MI, Palo Alto, CA). El sobrenadante o extracto enzimático crudo se mantuvo a 4 °C, para la posterior determinación de la actividad proteolítica.

La evaluación de la actividad proteolítica se llevó a cabo por triplicado empleando los métodos de Kunitz (1947), utilizando como sustrato caseína al 1% (disuelta en fosfatos 20 mM, pH 7, con NaCl al 0.9%) y el método de Anson reportado por Ouali y Valin (1980), utilizando hemoglobina al 1% (en una disolución amortiguadora universal 25 mM). Para la preparación de hemoglobina y caseína ver Anexo I. Los sustratos se incubaron a 35 °C durante 10 min en un baño de temperatura controlada antes de adicionar el extracto enzimático. Posteriormente se incubó por 10 min más para que se efectuara la hidrólisis. La reacción se detuvo con la adición de 0.25 mL de ácido tricloroacético al 50%. La mezcla de reacción se enfrió por 10 min a 4 °C, y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 11,000 rpm a 4 °C, para eliminar la proteína insoluble en ácido. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 280 nm, en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Fullerton. CA).

Una unidad de actividad proteolítica se definió como: la cantidad de enzima que produce un cambio de 0.001 de densidad óptica, a 280 nm en un minuto, bajo las condiciones establecidas acorde con Yamaguchi y col. (1982).

6.5. Capacidad de retención de agua

Se llevó a cabo mediante el método reportado por Hamm (1975) y el de Price y Schweigert (1994). Se colocaron 5 g de tejido muscular finamente picado en un tubo de centrifuga. Se añadieron 8 mL de una disolución de NaCl 0.6 M, se agitó con una varilla de vidrio durante 1 min en un baño de hielo. Posteriormente se dejó reposar durante 30 min, y se agitó de nuevo por 1 min. Se centrifugó a 8,000 rpm por 15 min, el sobrenadante se decantó y se midió el volumen no retenido. Se reportó el volumen de NaCl 0.6 M retenido por 100 g de músculo. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.6 pH

Se llevó a cabo mediante el método reportado por Owen y col., (1982). Se tomaron 10 g de músculo, el cual se homogeneizó con 90 mL de agua destilada durante 1 min usando una licuadora comercial (Oster, Bartsville, EUA). El homogenizado se filtró a través de una manta de cielo para eliminar el tejido conectivo. La determinación de pH se obtuvo con un potenciómetro digital (Conductronic 50-66Hz., 127V), previamente calibrado con un amortiguador de sodio y potasio a pH 4 y 7. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.7 Solubilidad

La solubilidad se determinó según el método propuesto por Pilosof (2000b), en el que las muestras de proteínas miofibrilares (5 mg/mL, a pH 7) fueron centrifugadas a 25,000 rpm durante 30 min a 4 °C. La concentración de proteína del sobrenadante

se determinó, reportándose la solubilidad como la relación entre el contenido de proteína del sobrenadante, y el contenido de proteína de la muestra sin centrifugar multiplicada por 100.

El contenido de proteína se determinó por el método de Biuret, según lo reportado por (Gornall y col., 1949). A 1 mL de muestra se le adicionaron 3 mL del reactivo de biuret, se agitó suavemente durante unos segundos para homogeneizar la mezcla, y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min en oscuridad. Se midió la absorbencia a 540 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-650 (Beckman, Fullerton, EUA). Los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patrón de albúmina bovina, con una concentración máxima de 10 mg/mL. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

6.8 Determinación de grupos sulfhidrilos

Se siguió la metodología reportada por Ellman (1959), y las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Se mezcló 1 mL de disolución proteica (5 mg/mL, a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10.4 g/L Tris; 6.9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8), dejando reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente, se tomaron 3 mL de dicha mezcla y se añadieron 50 μ L de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora) dejándose reposar durante 30 min. Transcurrido ese período, se midió la absorbencia a 412 nm. La concentración de grupos SH se calculó utilizando la ecuación 1.

$\mu\text{M-SH/g prote\u00edna} = (75.53 \times \text{Abs}_{412\text{nm}} \times 10) / \text{concentraci\u00f3n proteica} \dots\dots$ (ecuaci\u00f3n 1)

6.9 Medici\u00f3n de formaldeh\u00eddo (FA)

Para la determinaci\u00f3n de formaldeh\u00eddo (FA), se puso en pr\u00e1ctica el m\u00e9todo propuesto por el Comit\u00e9 de m\u00e9todos anal\u00edticos de la Real Sociedad de Qu\u00edmica (AMC, 1979), en el cual, se licuo 100g de m\u00fasculo con 200 mL de TCA al 2% durante 2 min y se filtr\u00f3 con papel filtro (Watman No. 40). Del filtrado recolectado se colocaron 2 mL en tubos de 20 X 200mm, en los cuales se agreg\u00f3 1 mL de disoluci\u00f3n de formaldeh\u00eddo (ver Anexo I para su preparaci\u00f3n), con 10 mL de tolueno y 3 mg de carbonato de potasio. Se mezcl\u00f3 en vortex durante 1 min. De la nueva disoluci\u00f3n se tomaron 2.5 mL de la fase superior, secada previamente con sulfato de sodio anhidro y se le adicionaron 2.5 mL de \u00e1cido p\u00edcrico (Anexo II). Por \u00faltimo se tom\u00f3 una muestra de esta \u00faltima, a la que se le ley\u00f3 su absorbancia a 410 nm en un espectrofot\u00f3metro Beckman DU-650 (Fullerton. CA). Los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patr\u00f3n de trimetilamina, de concentraci\u00f3n de 0-1.6 mg/mL.

6.10 Cambios estructurales mediante microscop\u00eda electr\u00f3nica de barrido (MEB)

El efecto del almacenamiento sobre la estructura del manto de calamar gigante, se observ\u00f3 mediante microscopia electr\u00f3nica de barrido (MEB).

- **Preparación de las muestras**

Se cortaron trozos pequeños del manto del calamar de aproximadamente 1 cm². Los cortes se realizaron longitudinalmente a las fibras musculares, con el fin de observar mejor a estas, tratando que el corte fuera firme y de un solo paso, usando navajas de afeitar nuevas.

- **Fijación primaria**

Los cortes se sumergieron en gluteraldehído disuelto al 5% en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4, hasta observar que las muestras tuvieran un color anaranjado oscuro, por un periodo de 24 hr aproximadamente. Posteriormente, los cortes se colocaron en viales de 2.5 mL que contenían la disolución de gluteraldehído durante 24 hr a 4 °C. Después se realizaron lavados de los cortes con un amortiguador de fosfatos 25 mM pH 7.4, hasta eliminar el olor a gluteraldehído.

- **Fijación secundaria**

Después de los lavados, los cortes se colocaron en una disolución de tetraóxido de osmio (Os₅O₄) durante 2 hr; y posteriormente se realizaron lavados utilizando etanol a las siguientes concentraciones 30, 40, 50, 70, 80, 90% y etanol absoluto, durante 20 min cada vez.

- **Desecación**

Terminados los lavados, las muestras se colocaron en microcápsulas de tipo poroso, se etiquetaron y se pusieron en contacto con etanol absoluto. Posteriormente se desecaron en un desecador de punto crítico Samdri-780 B (Sample Drying at the critical point, E. U. A.) a las condiciones arriba del punto crítico del CO₂: 1070 psi, 31

°C. Las muestras secas se almacenaron en un desecador para evitar su rehidratación por la humedad del medio ambiente. Posteriormente se colocaron en los portaobjetos, y se pegaron con cinta de carbón, para así realizar el proceso de recubrimiento con carbón y oro.

- **Recubrimiento**

El recubrimiento se realizó en un cubridor de posición por ionización (BAL-TEC SCD, Liechtenstein). Primero se realizó una cubierta por medio de una evaporación al vacío de carbón, y después una segunda con mezcla de oro-paladio por ionización al vacío. Una vez listas las muestras, se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Japón) a 8 KV de aceleración, con una resolución de 1000x y 4000x.

6.11 Extracción de proteínas miofibrilares

La extracción de proteínas miofibrilares se realizó de acuerdo a la técnica reportada por Ngapo y col. (1992), con algunas modificaciones. Se homogeneizaron 25 g de calamar con hielo y agua fría, en las siguientes proporciones (1:2:1 p/p) en una licuadora comercial (Oster, Bartsville, EUA), hasta integrar totalmente el tejido con el agua. Este extracto se mantuvo en agitación durante 10 min en baño de hielo, y posteriormente se filtró a través de un colador para eliminar el tejido conectivo. Se añadieron 2 volúmenes de agua fría y se agitaron 15 min. El homogeneizado se centrifugó a 3500 rpm durante 25 min a 4 °C, y el precipitado fue resuspendido en una disolución de amortiguador de fosfato 50 mM, pH 7, NaCl 0.6 M.

6.12 Propiedades de gelificación

6.12.1 Penetración de geles

La penetración de geles obtenidos de proteínas miofibrilares se realizó de acuerdo a lo reportado por Hickson y col. (1982), se llevaron a cabo 10 repeticiones. Esta consiste en determinar la fuerza requerida para introducir un émbolo dentro de una muestra de gel, metodología que ha sido utilizada para medir los cambios que ocurren en la textura de los alimentos durante el almacenamiento, y que ha mostrado una buena correlación con los análisis de tipo sensorial (Barroso y col., 1998). Disoluciones de proteína miofibrilar (con una concentración de 20-25 mg/mL, en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6, NaCl 0.6 M), se colocaron en tubos de vidrio de 30 mm de diámetro interno y 35 mm de alto. Los tubos se sumergieron en un baño de agua, sometiéndose a calentamiento gradual de 1°C/min, desde temperatura ambiente hasta 70 °C. Una vez alcanzada la temperatura final, los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 30 min, para luego ser almacenados bajo refrigeración durante 12 horas.

Los estudios de penetración se realizaron en un texturómetro TAX-T2 (Texture Technologies Corp., Scardale, EUA), equipado con el software Textur Expert™ (versión 1.20, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra), y con una celda de carga de 5 Kg. Los geles formados en los tubos se colocaron en una base, y se penetraron utilizando un émbolo de acrílico de 8 mm de diámetro. La elección del tipo de tubo para contener los geles y el diámetro del émbolo, estuvo de acuerdo al principio de “geometría semi-infinita” (Klettner, 1995), en donde el contenedor de la muestra debe ser por lo menos 3 veces mayor que el diámetro del émbolo. La velocidad de

descenso del émbolo y el porcentaje de la penetración se determinaron previamente. El valor obtenido fue el trabajo total o área bajo la curva, expresado en Newtons/seg.

6.13 Propiedades estructurales y reológicas de proteínas musculares.

La funcionalidad de los tejidos musculares depende de los cambios suscitados a nivel molecular que se reflejan en cambios micro estructurales y reológicos. Estos fueron evaluados mediante SDS-PAGE y estudios viscoelásticos.

6.14 SDS-PAGE

Las muestras, se analizaron por SDS-PAGE, utilizando la técnica reportada por García y col. (1993). Se analizaró volúmenes de 15 μ L de la muestra y 10 μ L de la mezcla de marcadores de peso molecular. El análisis se llevó a cabo a corriente constante de 200 Volts, utilizando un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, CA., E.U.A.) a 4 °C. Después del análisis, los geles se desmontaron y se tiñeron en una disolución 0.1% de azul de Coomasie R-250 durante 30-40 min. Posteriormente los geles se colocaron en una disolución desteñidora, haciendo los recambios necesarios de esta disolución, de forma que se pudieran ver con claridad las bandas de las proteínas en estudio.

La digitalización y análisis de los geles se llevó a cabo mediante un equipo Gel Doc 1000 BioRad (Richmond, CA., EUA). En la determinación de los pesos moleculares se utilizó a su vez el software "Molecular Analysis", con el que se graficó el Rf (distancia de migración desde la parte superior del gel hasta el centro de la banda de la proteína, entre la distancia que recorre el frente de color), de cada banda, contra el

logaritmo del peso molecular del patrón de referencia. Posteriormente se calculó el peso molecular de cada banda mediante la interpolación de cada Rf de las bandas problemas, en la curva patrón elaborada (Rf vs log PM).

6.15 Estudios reológicos dinámicos.

Los cambios reológicos de las proteínas miofibrilares durante la gelificación térmica, fueron analizados empleando un reómetro LS100 Paar Physica (Physica Mebtechnik GMBH, Stuttgart Germany). El material es sujeto a una deformación oscilatoria pequeña dentro de la región viscoelástica lineal, detectándose la magnitud de la onda de fuerza resultante. Debido al desarrollo gradual de la viscoelasticidad durante la gelificación, los geles y el proceso de gelificación son caracterizados en forma más adecuada por estudios de pequeña amplitud (Van Vliet, 1999). Se utilizó una geometría de platos paralelos de 40 mm de diámetro, utilizando un espacio entre platos de 1 mm. Los parámetros amplitud y frecuencia fueron seleccionados durante pruebas preliminares dentro de la región viscoelástica lineal. Las muestras fueron sometidas a un calentamiento gradual de 1°C/min de 25 a 80 °C, utilizando una unidad de control de temperatura. Los datos fueron recolectados cada 60 seg y el desarrollo del gel fue estudiado en tiempo real, mediante la medición de los cambios en el módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y $\tan \delta$ en función de la temperatura (Alvarez y col., 1998; Marcotte y col., 2001).

6.16 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza, comparación múltiple de medias de Duncan y análisis de correlación. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico "SPSS 8.0 for Windows".

Resultados y Discusión

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El músculo del manto de calamar fresco es blanco cremoso, elástico y firme con un olor característico. Sin embargo, durante el almacenamiento éste se oscurece paulatinamente, pierde firmeza y elasticidad, y su olor característico se torna desagradable tanto en refrigeración como en congelación.

Para todas las variables de respuesta y a las diferentes condiciones de almacen, el tiempo tiene un efecto significativo.

Los coeficientes de correlación entre todas las variables estudiadas se muestran en las tablas 27, 28 y 29 para las muestras almacenadas a 4, -20 y -80 °C, respectivamente. En general, se observó correlación significativa entre el tiempo y todas las variables analizadas en las muestras sujetas a las tres condiciones de almacén. Para las muestras almacenadas a 4 °C, se obtuvieron coeficientes de correlación negativos entre el tiempo y la actividad proteolítica, así como para los grupos sulfhidrido y la capacidad de gelificación; lo que sugiere que durante el tiempo de almacén estas variables disminuyen; en contraparte con el pH, CRA, FA y solubilidad cuyos coeficientes de correlación fueron positivos. A diferencia, las muestras almacenadas en congelación mostraron coeficientes de correlación negativos entre el tiempo de almacén y todas las variables analizadas con excepción de CRA y FA cuyo coeficiente de correlación fue positivo, siendo no significativo para el FA en muestras almacenadas a -20°C ($p=0.179$).

Se observó una alta correlación entre la fuerza de gel y las variables solubilidad, CRA, pH y actividad proteolítica, para el almacenamiento en refrigeración (Tabla 27), mientras que en congelación se presentó una alta correlación entre esta variable y la

actividad proteolítica (Tablas 28 y 29), lo cual podría indicar hidrólisis de las proteínas miofibrilares tiene como consecuencia una disminución en la fuerza de gel (Gráfica 20).

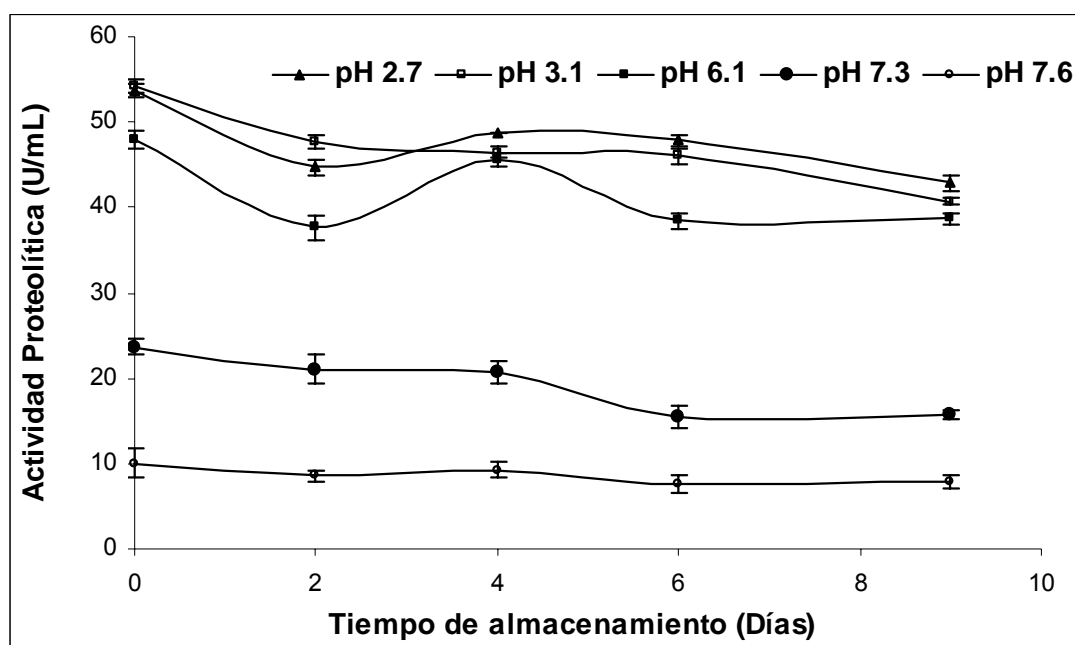
Los grupos sulfhidrilos presentaron una alta correlación con la actividad proteolítica para el almacenamiento en refrigeración (Tabla 27), lo que nos estaría indicando cambios en la estructura del tejido muscular.

7.1 Actividad proteolítica del extracto enzimático del músculo del calamar

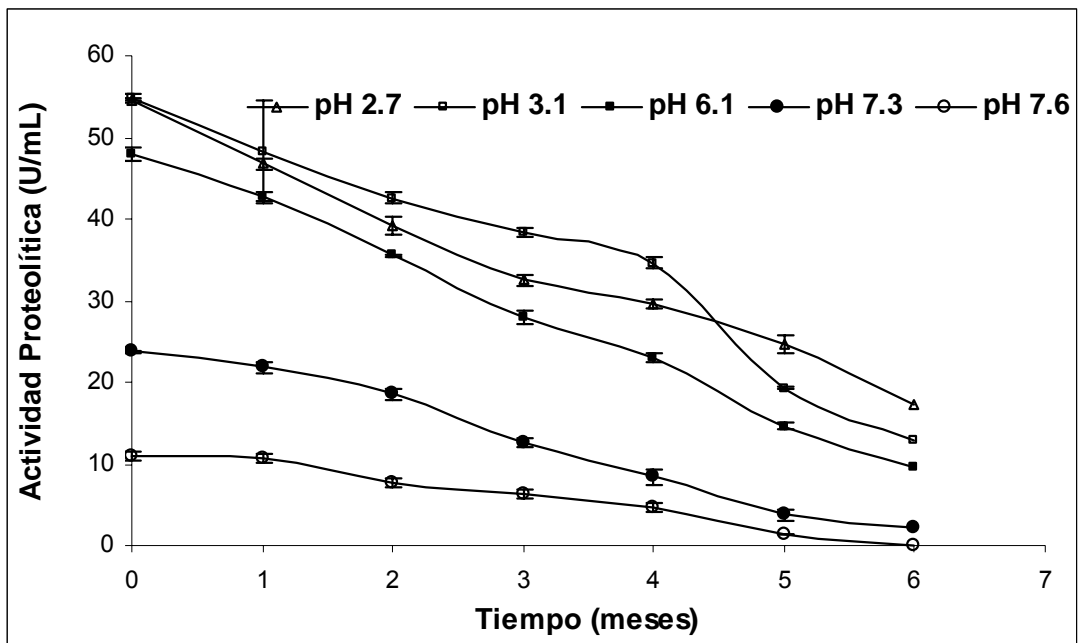
El pH y la temperatura a la cual se evaluó la actividad proteolítica en el extracto enzimático del calamar gigante fueron 2.7, 3.1, 6.1, 7.3 y 7.6, a 35 °C, éstas condiciones se establecieron en trabajos previos y corresponden a los valores de máxima actividad para proteasas ácidas y alcalinas (Dublán y col., 2002). El efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica del manto del calamar gigante se muestra en las Gráficas 2, 3 y 4, en la cuales se observa la actividad proteolítica de las proteasas almacenadas a 4°C, por 9 días y las almacenadas a -20 °C y -80°C, respectivamente, teniéndose diferencia significativa en cada una de ellas ($p < 0.001$), con respecto al pH, tiempo y temperatura de almacenamiento.

Sakai y col. (1981), observaron que la actividad máxima del extracto crudo del manto del calamar *Ommastrephes sloani pacificus* se obtuvo a un pH de 2.9 a un intervalo de temperatura de 35-40°C. Asimismo, Eillen y Gill (1982), determinaron que para las especies de calamar *Illex illecebrosus* y *Loligo pelalei teseur*, la actividad máxima de sus proteasas se sitúa a un pH de 2.6 y 3.6 respectivamente; aunque también observaron actividad a pH alcalino (7.5-8.9). Okamoto y col. (1993), determinaron que las dos metaloproteasas (miosinasa I y miosinasa II), del manto del

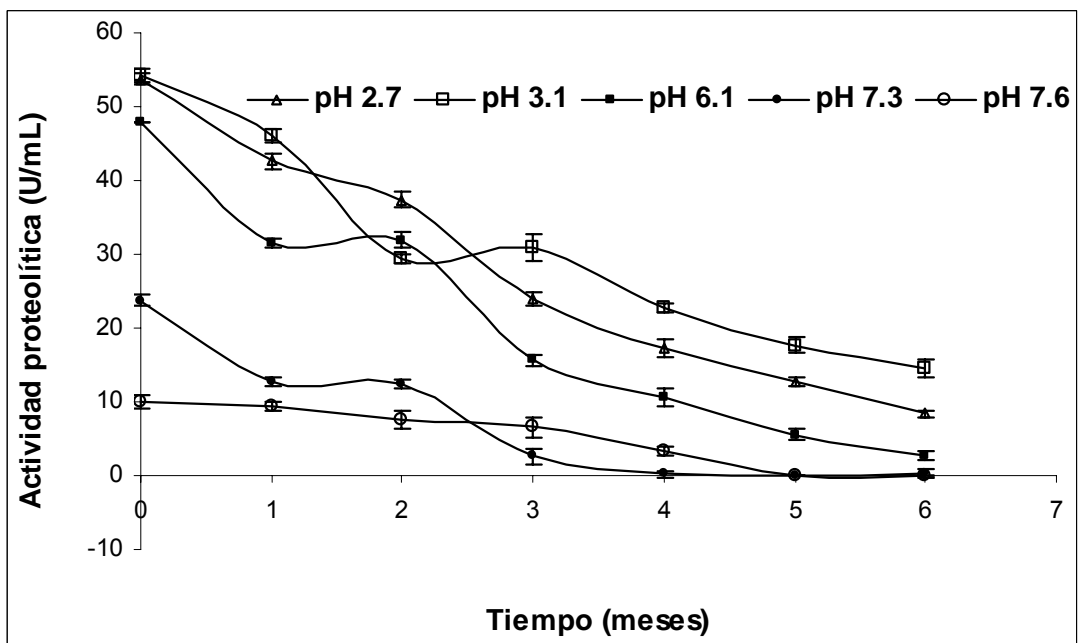
calamar *Todarodes pacificus* presentan una actividad óptima a pH de 7 y a una temperatura de 40°C. En el extracto obtenido del hígado del calamar *Illex argentinus*, se determinó una actividad proteolítica en un intervalo de pH de 2.6 a 4 (Kolodziejska y col., 1994a). Por otro lado Castellanos y Hernández (2005), realizaron estudios con el extracto crudo del manto del calamar gigante *Dosidicus gigas*, en el cual encontraron que la actividad máxima del extracto se presentó a un pH de 3 y 7 a 35 °C, coincidiendo con lo reportado en este trabajo.



Gráfica 2. Actividad proteolítica del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en refrigeración a 4°C.



Gráfica 3. Actividad proteolítica del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en congelación a -20°C .



Gráfica 4. Actividad proteolítica del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en congelación a -80°C .

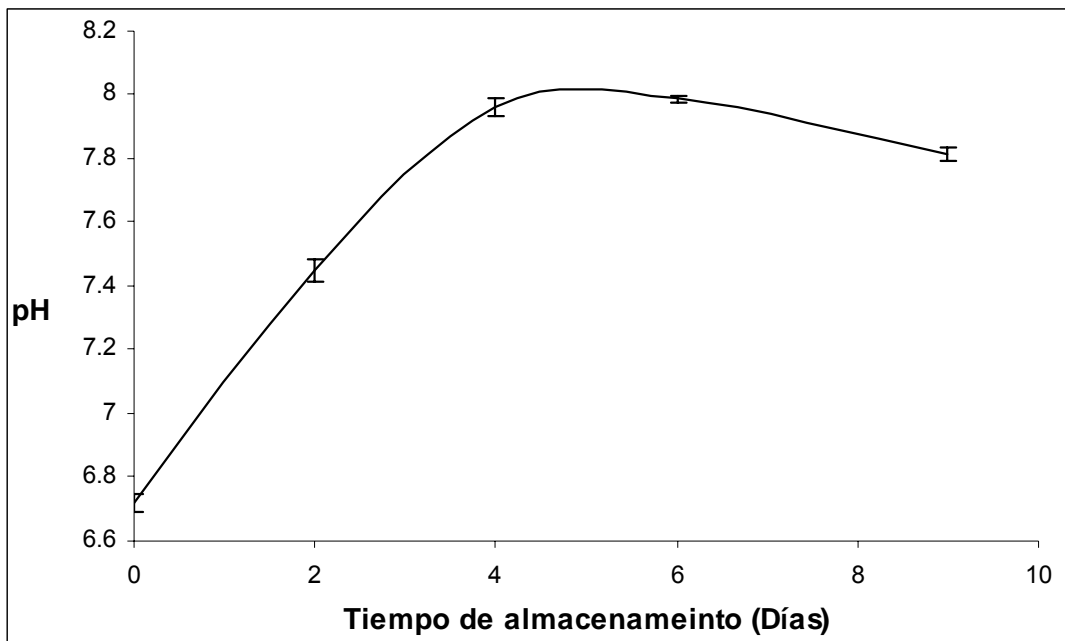
Las endopeptidasas son las proteasas más utilizadas en el procesamiento de alimentos, por ejemplo las proteasas del hígado del calamar podrían tener un uso potencial para su aplicación en el procesamiento de especies marinas y en otras ramas de la industria alimentaria. Asimismo, tanto el hígado como el páncreas del calamar son una buena fuente de enzimas que han sido utilizadas para incrementar la velocidad de proteólisis en la preparación de salsa de pescado (Kolodziejska y col., 1994a).

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales problemas del deterioro de peces y mariscos es la rápida pérdida de textura que está directamente relacionada con la actividad de proteasas endógenas. Para incrementar la vida de anaquel de este tipo de productos es necesario controlar su actividad autolítica, asegurar un manejo higiénico y emplear temperatura de refrigeración o congelación adecuadas (Ashie y col., 1996).

Por lo general, la congelación no inactiva por completo la mayoría de las enzimas, aunque a temperaturas muy bajas la actividad disminuye considerablemente (Sikorski y Kolakowska, 1994a; Ebina y col., 1995). Al obtener el extracto enzimático a partir del músculo del calamar gigante conservado a 4 °C, como en congelación (– 20 °C y – 80 °C), si bien se presentó una reducción gradual de la actividad proteolítica, la actividad residual es aún elevada, y pudo alterar al producto durante el almacenamiento, deshielo y manejo posterior (Shenouda, 1989; Sikorski y Kolakowska, 1994a). Recientemente, Kuwahara y col. (2004), así como Yoshioka y col. (2005) reportaron que la adición de sales de citrato, tartrato y gluconato de sodio puede reducir efectivamente la actividad de serin-proteasas y metalo-proteasas de manera similar a la acción combinada de EDTA y PMSF.

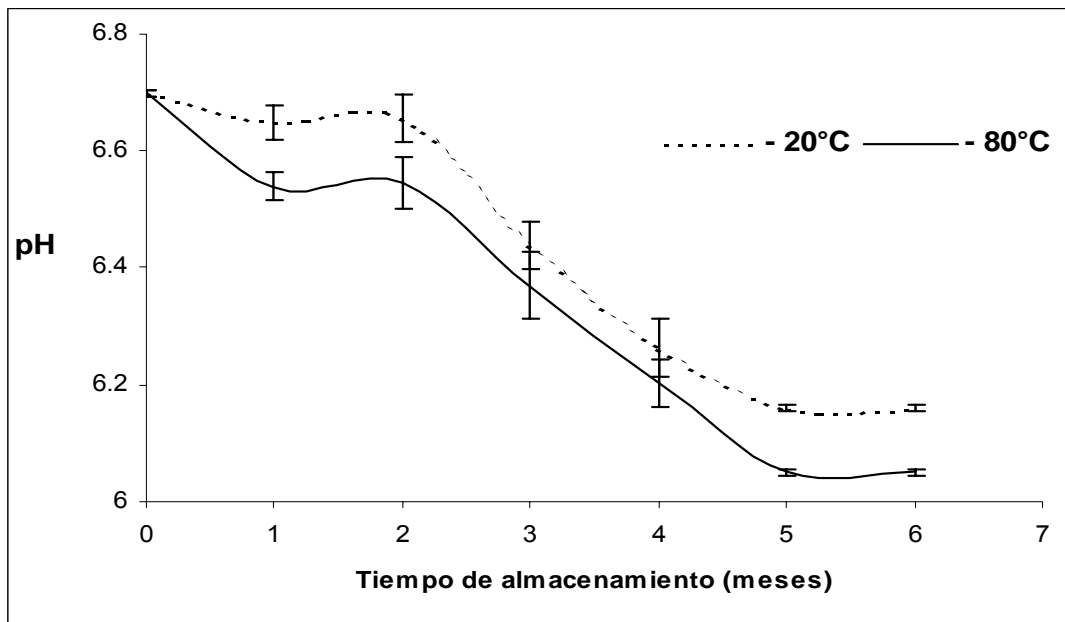
7.2 pH

En la Gráfica 5, se observa el efecto del almacenamiento sobre el pH, teniéndose diferencia significativa con respecto al tiempo de almacen ($p < 0.001$). Durante el almacenamiento del manto del calamar a 4°C, el pH aumentó desde un valor inicial de 6.4 hasta 7.9 al cabo de nueve días, debido posiblemente a la descomposición de los compuestos nitrogenados lo cual provoca el incremento del pH en el músculo de productos marinos, coincidiendo con lo reportado por Stroud y col. (1982), y Sirkoski y col. (1994). El incremento en el pH induce un aumento en la carga neta negativa de las proteínas, y una mayor fuerza de repulsión intermolecular provocando un ensanchamiento de la matriz proteica. Al mismo tiempo que se incrementa la fuerza de atracción electrostática con el agua, por lo que el incremento en el pH pudo estar asociado a los cambios de otras propiedades funcionales (Flores y Bermell, 1984). Como lo muestra el análisis de correlación, en donde observa una correlación positiva del pH con la CRA, FA y la solubilidad; asimismo, se obtuvo una correlación negativa entre el pH y la capacidad de gelificación, grupos SH y la actividad proteolítica (Tabla 27).



Gráfica 5. Cambios en el pH del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a 4°C.

Para las muestras almacenadas en congelación se presentó diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al tiempo, ya que el pH disminuyó paulatinamente a partir del segundo mes; siendo este cambio más evidente para el músculo almacenado a -80°C . En ambas condiciones el pH disminuyó desde un valor inicial de 6.7 hasta un valor inferior a 6.2 (Gráfica 6). Como se mencionó anteriormente, esta variación de pH pudo modificar otras variables de respuesta como la solubilidad y la CRA, dado que se obtuvieron coeficientes de correlación significativos entre el pH y todas las variables de respuesta analizadas con excepción del FA (Tablas 28 y 29).

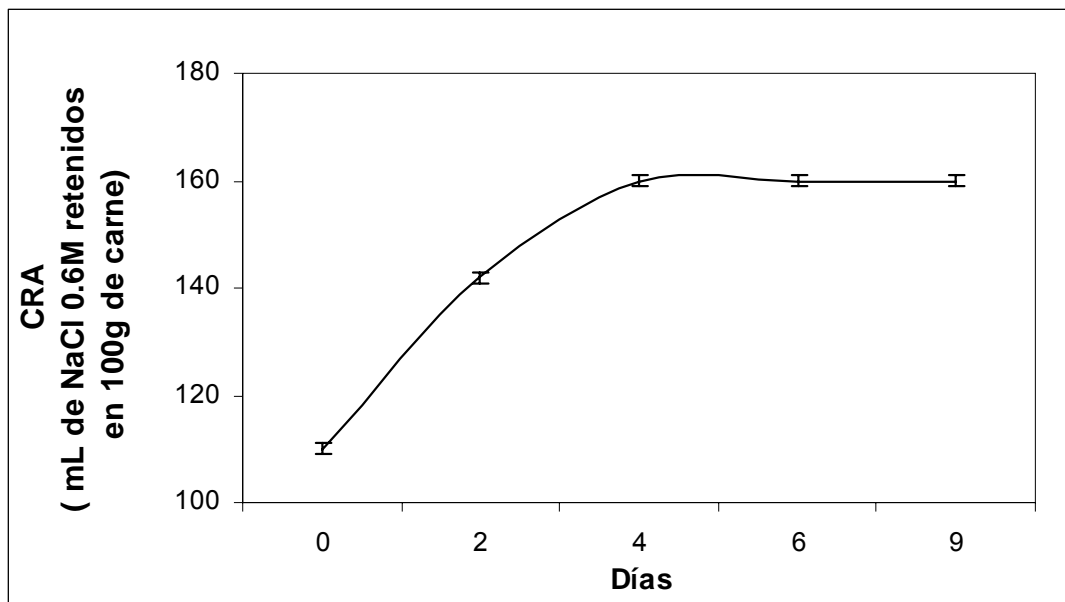


Gráfica 6. Cambios en pH del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -20°C y a -80°C .

7.3. Capacidad de retención de agua (CRA)

Se observó un aumento de la CRA del manto de calamar gigante durante los primeros 6 días de almacenamiento a 4°C y posteriormente se mantuvo constante, alcanzando valores de 160 mL de NaCl 0.6M retenidos en 100g de carne de acuerdo a la técnica utilizada. El análisis de varianza mostró diferencia significativa con respecto al tiempo de almacenamiento ($p < 0.001$) (gráfica 7). La cantidad de agua que está inmovilizada en el interior del tejido muscular, depende de la forma en que las proteínas miofibrilares estén organizadas; es decir, de la disposición de los filamentos de actina y miosina. Se sabe que el entramado proteico está constituido por una red tridimensional de filamentos delgados y gruesos, dentro de la unidad de la fibra muscular. Cuando decrece la cohesión entre los filamentos de actina y miosina, la longitud del sarcómero aumenta, lo cual facilita una mayor retención de agua (Flores y Bermell, 1984), esto

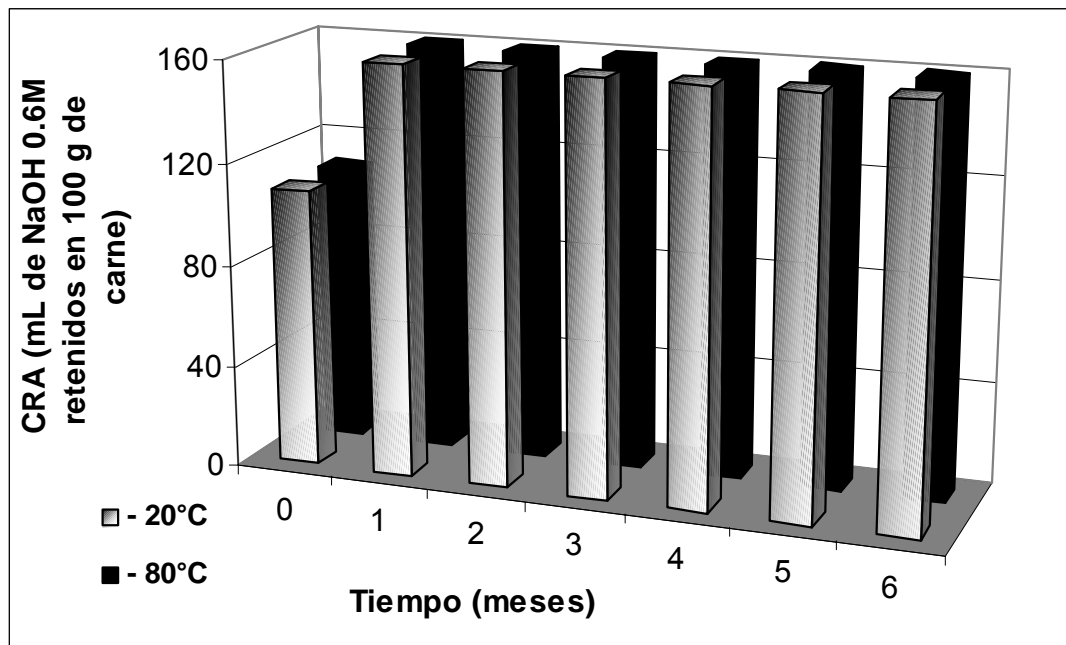
puede ser el reflejo del aumento del pH o a la acción de proteasas durante el periodo de almacenamiento. La capacidad de retención de agua en carnes es una propiedad funcional que se encuentra íntimamente relacionada con el pH de las mismas, de tal manera que la CRA es mínima en el llamado punto isoeléctrico (pI) de las proteínas (Knipe, 1992). Para la CRA se obtuvieron coeficientes de correlación positivos con respecto al tiempo, pH, FA y solubilidad; y coeficientes negativos con respecto a la fuerza de gel, grupos SH y actividad proteolítica para el material almacenado en refrigeración (Tabla 27).



Gráfica 7. Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), almacenado a 4°C.

En el músculo almacenado a -20 y -80 °C se observó que el pH disminuyó de 6.7 a 6.05 (gráfica 6), sin embargo, no se alcanzó el punto isoeléctrico de las proteínas, la CRA (gráfica 8) presentó diferencia significativa entre los valores obtenidos para

músculo fresco y para músculo almacenado en congelación para ambas temperaturas ($p < 0.001$), sin embargo, no mostró diferencia significativa a partir del primer mes con respecto al tiempo de almacenamiento (tablas 10 y 11 respectivamente) alcanzando valores máximos de 160 mL de NaCl 0.6M retenidos en 100g de carne. Asimismo, como se muestra en el perfil electroforético, las proteínas miofibrilares mantuvieron su integridad, teniéndose de esta manera la capacidad de retener el agua. Como se mencionó anteriormente, dependiendo de la forma y organización en que se encuentran las proteínas miofibrilares, tendrán la disposición de formar puentes de hidrógeno con el agua. Con esto se puede decir, que durante éste periodo de almacenamiento algunas propiedades funcionales de las proteínas no están afectadas en su totalidad. A diferencia de las muestras almacenadas en refrigeración, las muestras almacenadas a -20 y -80°C mostraron menores coeficientes de correlación con respecto a otras variables analizadas (Tablas 28 y 29).

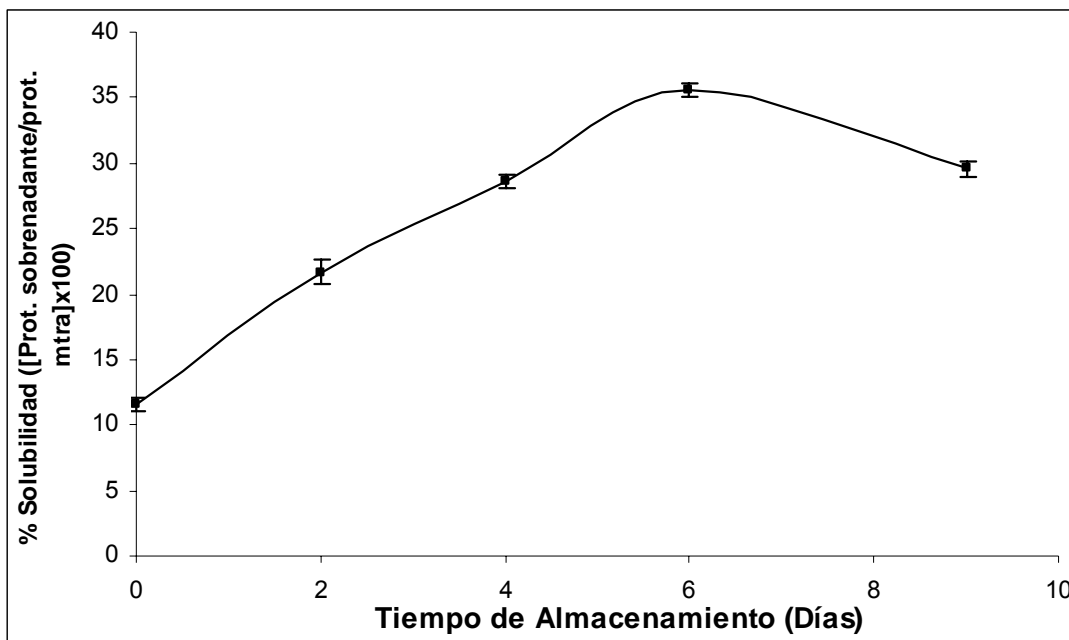


Gráfica 8. Cambios en la capacidad de retención de agua (CRA) del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), almacenado a -20 y -80°C .

7.4 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas depende del estado físicoquímico de sus moléculas, el cual puede ser alterado por el calentamiento, procesamiento, secado y almacenamiento a bajas temperaturas. La solubilidad de la mayoría de las proteínas depende del pH, fuerza iónica y temperatura entre otros. En la Gráfica 9 se muestra el efecto del almacenamiento a 4°C sobre la solubilidad de las proteínas extraídas del manto del calamar gigante, habiendo diferencia significativa con respecto al tiempo de almacen (p<0.001). Como se puede observar, la solubilidad proteica aumentó, esto puede ser debido a que el cambio del pH modificó la carga neta de las proteínas y por lo tanto el balance electrostático. Asimismo, durante el periodo de almacenamiento hubo degradación de las proteínas miofibrilares, causada posiblemente por acción de enzimas endógenas, obteniéndose proteínas de bajo peso molecular que fueron

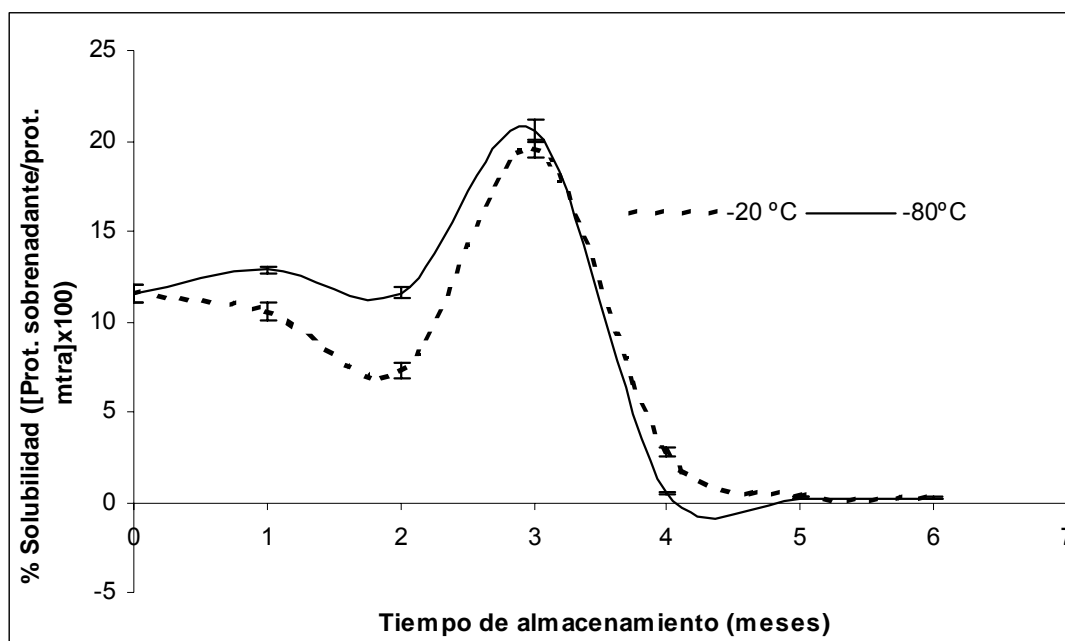
evidentes en SDS-PAGE, las cuales son más solubles, dando como resultado el incremento de la solubilidad. Pilosof (2002b), explica que la solubilidad es mínima en las cercanías del punto isoelectrico, en este caso al transcurrir el periodo de almacenamiento las proteínas se “alejaron” de su punto isoelectrico, por lo que el incremento en la solubilidad pudo deberse al efecto combinado de la hidrólisis y del incremento de pH en el sustrato.



Gráfica 9. Efecto del almacenamiento a 4 °C sobre la solubilidad de las proteínas miofibrilares del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

En la Gráfica 10, se muestra el efecto del almacenamiento sobre la solubilidad de las proteínas miofibrilares almacenadas a -20 y -80 °C, habiendo diferencia significativa ($p < 0.001$), observándose que a -80 °C, ésta se mantiene prácticamente constante en los dos primeros meses de almacenamiento, no siendo así para -20 °C, ya que disminuyó en el segundo mes de almacenamiento, coincidiendo con lo reportado

por Ramírez y col. (2000). Sin embargo, tomando en cuenta el pH del sistema, su CRA y el perfil electroforético no están alterados durante este tiempo. A partir del tercer mes de almacenamiento la solubilidad se incrementó, esto puede ser debido a la acción de las enzimas presentes en el músculo, así como recristalización, y posiblemente ruptura del tejido muscular (Shenouda, 1989, Sikorski y Kolakowska, 1994a). En el cuarto mes de almacenamiento la solubilidad disminuyó considerablemente, debido posiblemente debido a que se llevó a cabo el proceso de desnaturalización y/o agregación. Matsumoto (1980) propuso que en los primeros estadios de la congelación, los filamentos se presentan estructurados en forma de punta de flecha y entrecruzados. En periodos prolongados de congelación, el proceso de agregación va acentuándose dando origen a la formación una red más estructurada. Además, ocurren fenómenos de disociación de la actomiosina en actina F y miosina, de forma que los filamentos de actina F se agregan y los monómeros de miosina se repliegan sobre sí mismos, dando lugar a una agregación compleja de la actina y miosina (Cofrades, 1994), provocando una disminución en la solubilidad. Asimismo, se ha observado que en los músculos congelados de algunas especies de productos marinos, el óxido de trimetilamina, se degrada hasta trimetilamina y formaldehído. El aldehído generado durante el almacenamiento en congelación, reacciona con algunos grupos funcionales y forma puentes metilénicos intra- e intermoleculares. Estas reacciones pueden provocar la formación de agregados proteicos que reducen la solubilidad proteica (Sikorski y Kolakowska, 1994b).



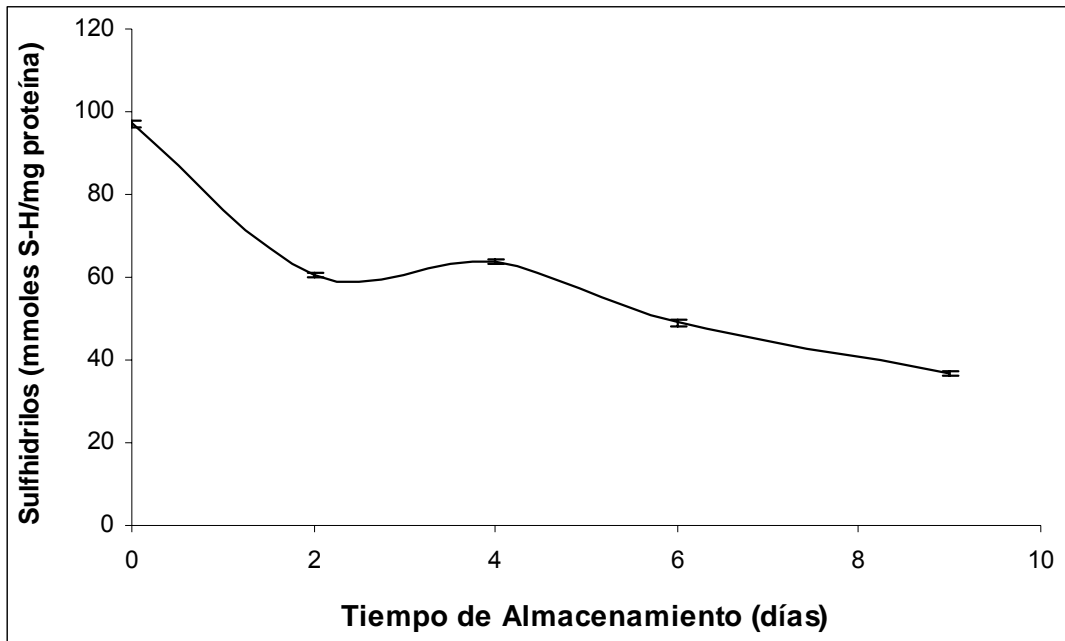
Gráfica 10. Efecto del almacenamiento a -20 y -80 °C sobre la solubilidad de las proteínas miofibrilares del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

7.5 Determinación de concentración de grupos sulfhidrilos

La desnaturalización proteica en las carnes, ya sea por almacenamiento o por procesamiento de las mismas, influye en la concentración de los grupos sulfhidrilos vinculados a las proteínas, por lo que también modifica la conformación molecular y la actividad superficial de las mismas (Ancin y col., 1989; Damodaran, 1994).

Durante el periodo de almacenamiento a 4 °C (Gráfica 11), se observó una disminución gradual en el número de grupos $-SH$ ($p < 0.001$), coincidiendo con lo reportado por Chen y col. (1989) y Buttkus, (1970). Una disminución similar en la concentración de grupos sulfhidrilos libres, fue descrita por Ishioroshi y col. (1979) en carne almacenada bajo refrigeración durante 15 días, atribuyéndola a fenómenos de

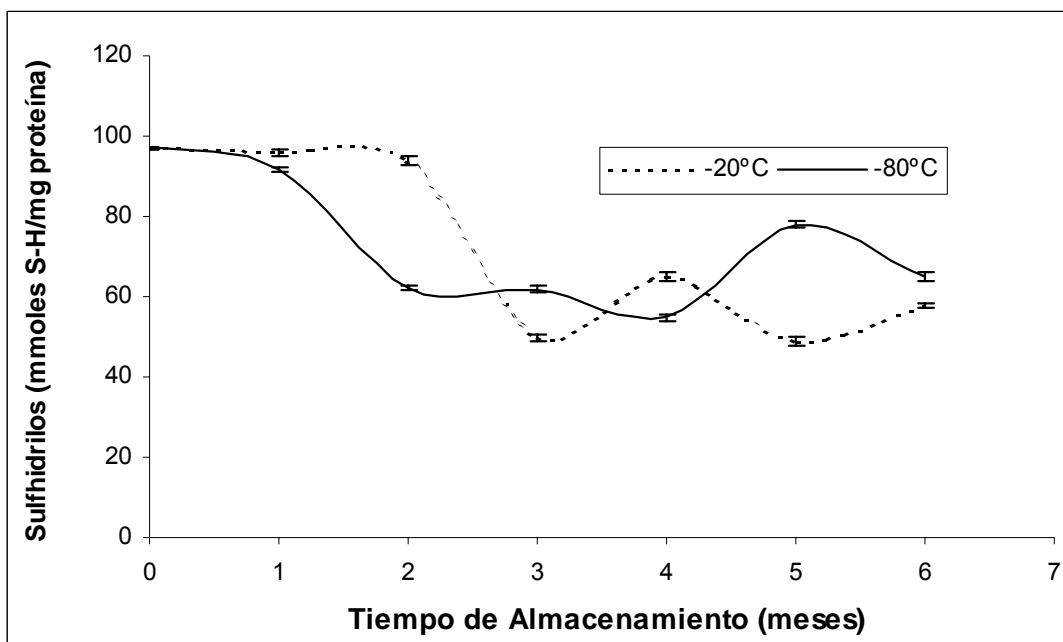
agregación de miosina, debidos a la oxidación de los grupos SH y a una posterior interacción intermolecular durante el almacenamiento.



Gráfica 11. Número de grupos sulfhidrilos (μ moles $-SH/g$ de proteína) en el tejido muscular del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento a $4^{\circ}C$.

En el músculo almacenado a $-20^{\circ}C$ (Gráfica 12), no se observó variación durante los primeros dos meses. A partir del tercero, al igual que ocurrió con el músculo almacenado a $-80^{\circ}C$, se observó una disminución paulatina en el número de grupos $-SH$ ($p < 0.001$). Esta disminución puede corresponder a las variaciones de la solubilización de las proteínas. Asimismo, este fenómeno puede ser asociado también a la formación de puentes disulfuro intramoleculares como consecuencia de los cambios conformacionales que ocurren durante el periodo de almacenamiento. Al respecto se

cree que ocurren cambios en la estructura terciaria de la miosina, debidos a la formación de enlaces disulfuros, puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos; consecuentemente, los grupos sulfhidrilos que estaban enmascarados en las moléculas de la miosina son expuestos, y por lo tanto oxidados a disulfuros (Jiang y col. 1988a y 1988b; Chen y col., 1989; Ramírez y col., 2000).



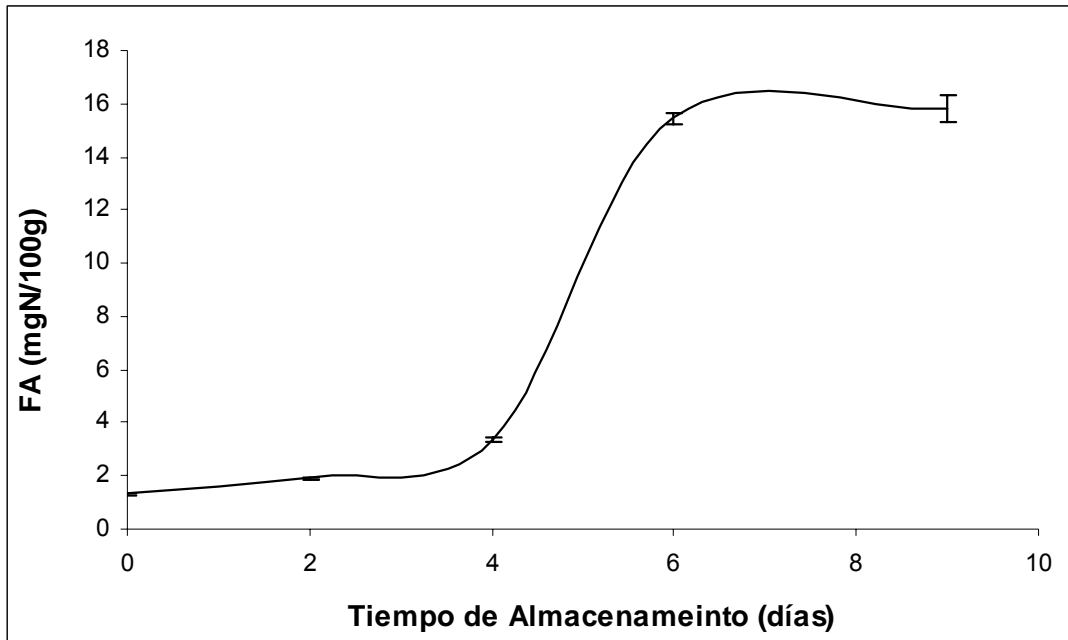
Gráfica 12. Número de grupos sulfhidrilos (μ moles $-SH/g$ de proteína) en el tejido muscular del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento a -20 y -80 °C.

Se ha demostrado que la agregación de la miosina y la actina durante el periodo de almacenamiento en congelación, se debe al establecimiento de interacciones cabeza-cabeza involucrando la formación de enlaces disulfuro (Samejima y col., 1981; Chen y col., 1989; Sikorski y Kolakowska, 1994a; Ramírez y col., 2000).

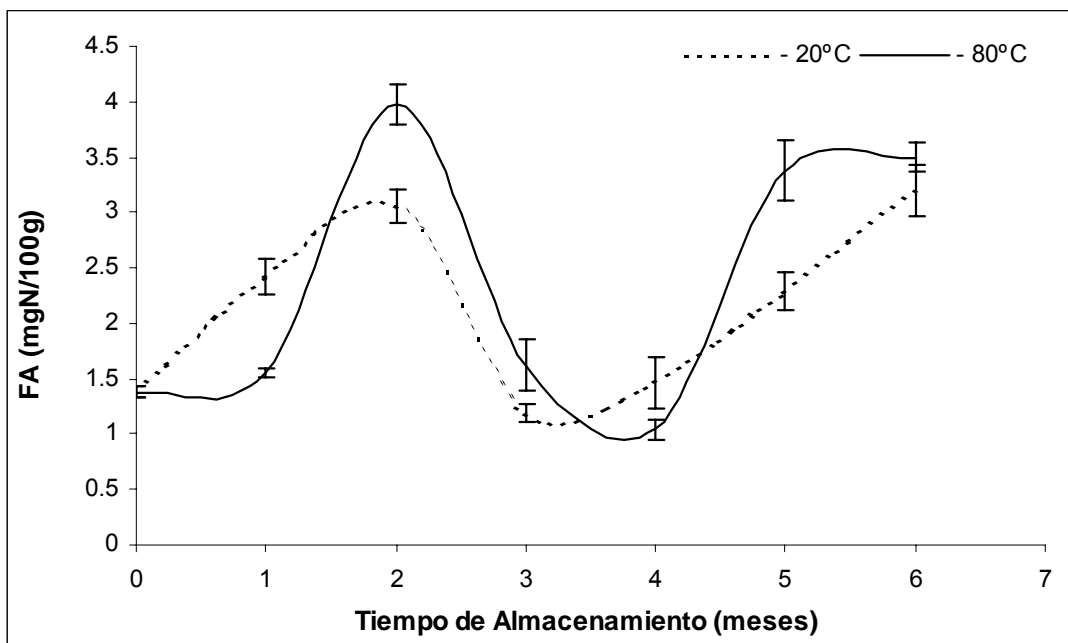
7.6 Determinación de Formaldehído.

La concentración de FA (Gráfica 13) para las muestras almacenadas a 4 °C aumento rápidamente a partir del cuatro días de almacenamiento, alcanzando valores de 15.8 mg/100g a los nueve días, indicando que el producto se encontraba en descomposición, ya que la concentración máxima permitida de FA para productos frescos es de 6.4-7 mg/100g. Corroborándose esto con los con los resultados del perfil electroforético, en el cual se observa una importante degradación de la miosina y la paramiosina. No siendo así para el producto almacenado a -20 y a -80 °C (Gráfica 14), ya que la concentración de FA fue inferior a 4 mg/100g proteína. Sin embargo, esta concentración de FA puede contribuir a la agregación de proteínas y en consecuencia a la disminución de la solubilidad, como se observó en las muestras almacenadas a -20 y -80 °C (Gráfica 10).

El FA es capaz de reaccionar con varios grupos funcionales de las proteínas, induciendo un cambio en la conformación, por la formación de enlaces cruzados y por un incremento en la hidrofobicidad de las proteínas y llevar a la formación de agregados reforzados por enlaces no covalentes. Por lo que la presencia de FA puede causar desnaturalización proteica, reducción de la actividad enzimática y endurecimiento del tejido (Hultin, 1993; Sikorski y Kolakowska, 1994b).



Gráfica 13. Producción de FA en el músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a 4°C.



Gráfica 14. Producción de formaldehído en el músculo del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -20 y -80°C.

7.7 Perfil electroforético de las proteínas miofibrilares

El análisis electroforético fue llevado a cabo para determinar el patrón de degradación de las proteínas miofibrilares durante el periodo de almacenamiento.

En las Figuras 4 y 5, se muestra el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar almacenado a 4°C durante 9 días y almacenado a - 20°C y - 80°C por un periodo de 6 meses, respectivamente.

En el perfil electroforético a 4°C se observó una pérdida progresiva de las proteínas de elevado peso molecular durante el periodo de almacenamiento, principalmente la miosina y la paramiosina, en donde la banda de la miosina desaparece. Esto pudo ser debido a la presencia de enzimas proteolíticas en el tejido muscular del calamar, pues se ha observado, que durante este periodo continuó la actividad enzimática, dando como resultado la aparición de bandas proteicas de bajo peso molecular.

Roncalés y col. (1995), reportaron que a nivel ultraestructural las calpainas deterioraron rápidamente la línea Z de las proteínas miofibrillas, alterando la estructura de tejido por la separación de las fibras musculares y debilitamiento de las fuerzas conectivas, así como al ablandamiento del músculo del calamar durante la refrigeración (Ando y col., 1999). La desintegración de las fibras de la colágena se atribuye al propio proceso de ablandamiento (Sato y col., 1997); así como a la actividad de la catepsina D (Weston y col., 1969; Zeece y col., 1986; Zeece y Katoh, 1989).

Las troponinas I y T son degradadas por las calpainas (Di Lisa y col., 1995), produciendo fragmentos de peso molecular bajo de 27,000 a 30,000 Da (Robson y col.,

1997), lo cual es un indicador de proteólisis (Steen y col., 1997) y que se traduce en un ablandamiento en el músculo durante su almacenamiento (Oliveira, 1998).

Se ha postulado también que el ablandamiento del tejido muscular es debido a la degradación de los filamentos intermediarios tales como la nebulina, la cual es una proteína degradada rápidamente en condiciones *postmortem*, modificando la estructura miofibrilar (Fritz y Greaser, 1991; Greaser y Fritz 1995). Fritz y Greaser (1991) reportaron la degradación total de nebulina en el músculo de bovino, después de 2 días de almacenamiento en refrigeración.

La catepsina D ha sido una de las enzimas más estudiadas en relación con su efecto sobre la degradación del tejido muscular (Zeece y col., 1986; Zeece y Katoh, 1989), en particular su capacidad para degradar la miosina (ambas cadenas, ligeras y pesadas); la actina y las proteínas del complejo regulatorio (la tropomiosina y troponinas T e I). Del mismo modo Ouali y col. (1987), observaron que las proteínas miofibrilares fueron hidrolizadas por las catepsinas B, D y L, causando también degradación en la línea Z y bandas M.

Todo esto se relaciona también con el efecto del aumento del pH y de la capacidad de retención de agua, ya que al haber un aumento de éstos con respecto al tiempo de almacenamiento hay un aumento en la capacidad de hidratación de las miofibrillas; esto conlleva una desintegración de la estructura miofibrilar en la banda I. La pérdida de integridad de la línea Z permite la entrada de más moléculas de agua en la red, y consecuentemente un aumento en la CRA (Pedersen, 1994), observándose a nivel microscópico una separación y elongamiento de las miofibrillas aunado al aumento de pH.

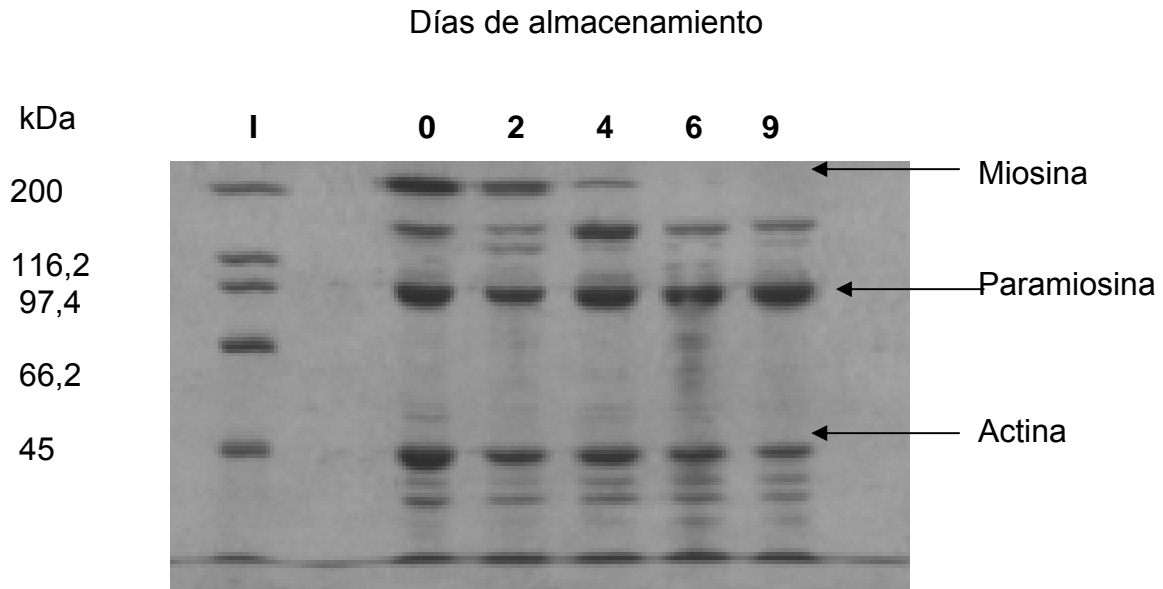


Figura 4. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a 4°C. Carril I: Marcador de pesos moleculares. Carril II: tiempo cero. Carril III. Día 2. Carril IV día 4. Carril V: día 6. Carril VI: día 9.

Durante el almacenamiento en congelación a -20 y -80 °C, las proteínas miofibrilares se mantuvieron prácticamente íntegras; sin embargo, a partir del segundo mes en ambas temperaturas se inicia la degradación de las proteínas miofibrilares, y la aparición de nuevas bandas de pesos moleculares más bajos coincidiendo con lo reportado por Park (1994), siendo más marcado este efecto a -80 °C. A partir del tercer mes, el proceso de degradación no solo se podría estar dando por hidrólisis enzimática, sino también por las reacciones durante la congelación, como disociación y agregación; fenómenos que podrían darse simultáneamente, debido a la disminución del agua libre presente durante el periodo de almacenamiento, siendo más evidente a -80 °C.

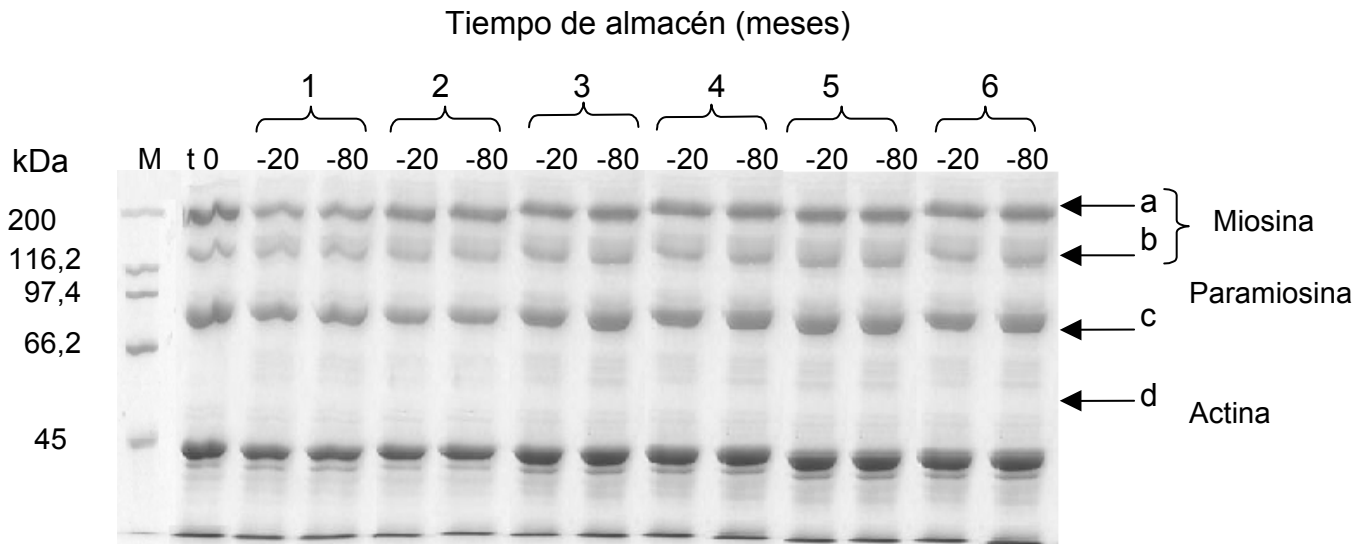


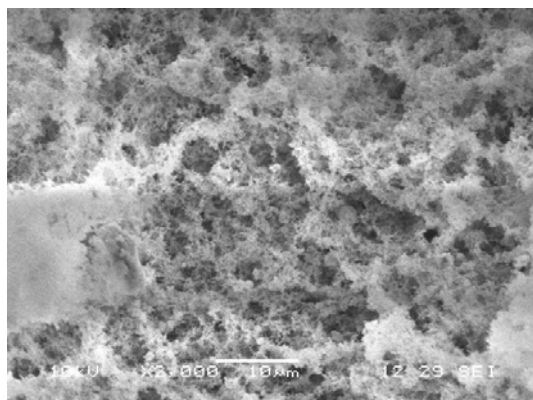
Figura 5. SDS-PAGE de las proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*). Carril I: Marcador de pesos moleculares. Carril II: tiempo cero. Carril III: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (primer mes). Carril IV: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (primer mes). Carril V: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (segundo mes). Carril VI: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (segundo mes). Carril VII: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tercer mes). Carril VIII: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (tercer mes). Carril IX: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cuarto mes). Carril X: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cuarto mes). Carril XI: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (quinto mes). Carril XII: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (quinto mes). Carril XIII: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sexto mes). Carril XIV: $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sexto mes).

7.8 Cambios estructurales mediante microscopía electrónica de barrido (MEB)

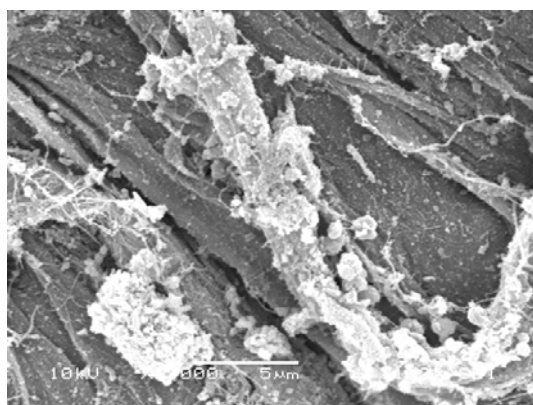
En las Figuras 6 y 7, se muestran las micrografías del manto del calamar almacenamiento en refrigeración y congelación, respectivamente.

Como se observa en las Figura 6-A, en el primer día el tejido estaba intacto, ya que no se observó rompimiento de fibras musculares como de la colágena. Al día 9 se observó que las células musculares estaban más separadas y desorganizadas, debido probablemente a la degradación de las proteínas miofibrilares antes mencionadas, por las proteasas presentes en el mismo músculo. En el último día de almacenamiento se observó que la pérdida significativa de la calidad del tejido muscular, fue causada por la

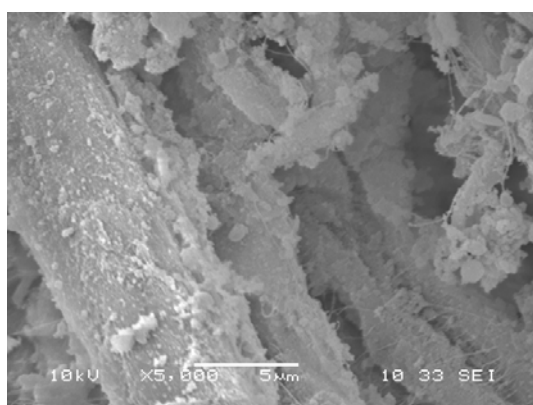
degradación enzimática, tanto de la colágena como de las proteínas miofibrilares en el tejido crudo del calamar gigante, lo cual coincide con lo reportado en estudios previos por Dublán y col., (2001), y también por Oliveira (1998) y Kolodziejska y Sikorski (1996). Asimismo, la degradación del tejido conector puede estar asociada a la actividad de cistein proteasas, como lo reporta Miura-Yokota y col. (2004) en calamar *Todarodes pacificus*. Los cambios estructurales se relacionan con el aumento del pH y de la capacidad de retención de agua, ya que propician un incremento en el contenido de agua de las miofibrillas, y favorece una desintegración de la estructura miofibrilar en la banda I. La pérdida de integridad de la línea Z permite la entrada de más moléculas de agua en la red, y consecuentemente un aumento en la CRA (Pedersen, 1994), observándose a nivel microscópico una separación y elongamiento de las miofibrillas; aunado también al aumento de pH.



A) Tiempo cero



B) Día 4



C) Día 9

Figura 6. Micrografías del manto del calamar gigante almacenado en refrigeración a 4°C. Aumento 2000x.

Durante el primer mes de almacenamiento en congelación (Figura 7), las células del músculo se empezaron a separar una de otra coincidiendo con lo estudiado por Ando y col. (1999). Al mes 3 (Figura 7), se observó que las células musculares estaban más separadas y desorganizadas, debido probablemente a la degradación de las proteínas miofibrilares ya mencionadas, y también por la degradación de la desmina. Se ha reportado que la destrucción de esta proteína causa la reducción en el alineamiento del sarcómero de las miofibrillas, lo cual ocurre durante el almacenamiento (Greaser y Fritz, 1995). Al mes 6 (Figura 7), se observó un total desorden en las fibras, lo cual podría deberse a la actividad proteolítica, la producción de formaldehído, y el efecto de la congelación, observándose más daño del producto a -80°C . En general, todos los cambios en la integridad se reflejan en la pérdida de la textura, medida como la reducción en la fuerza de gelificación (gráficas 19 y 20).

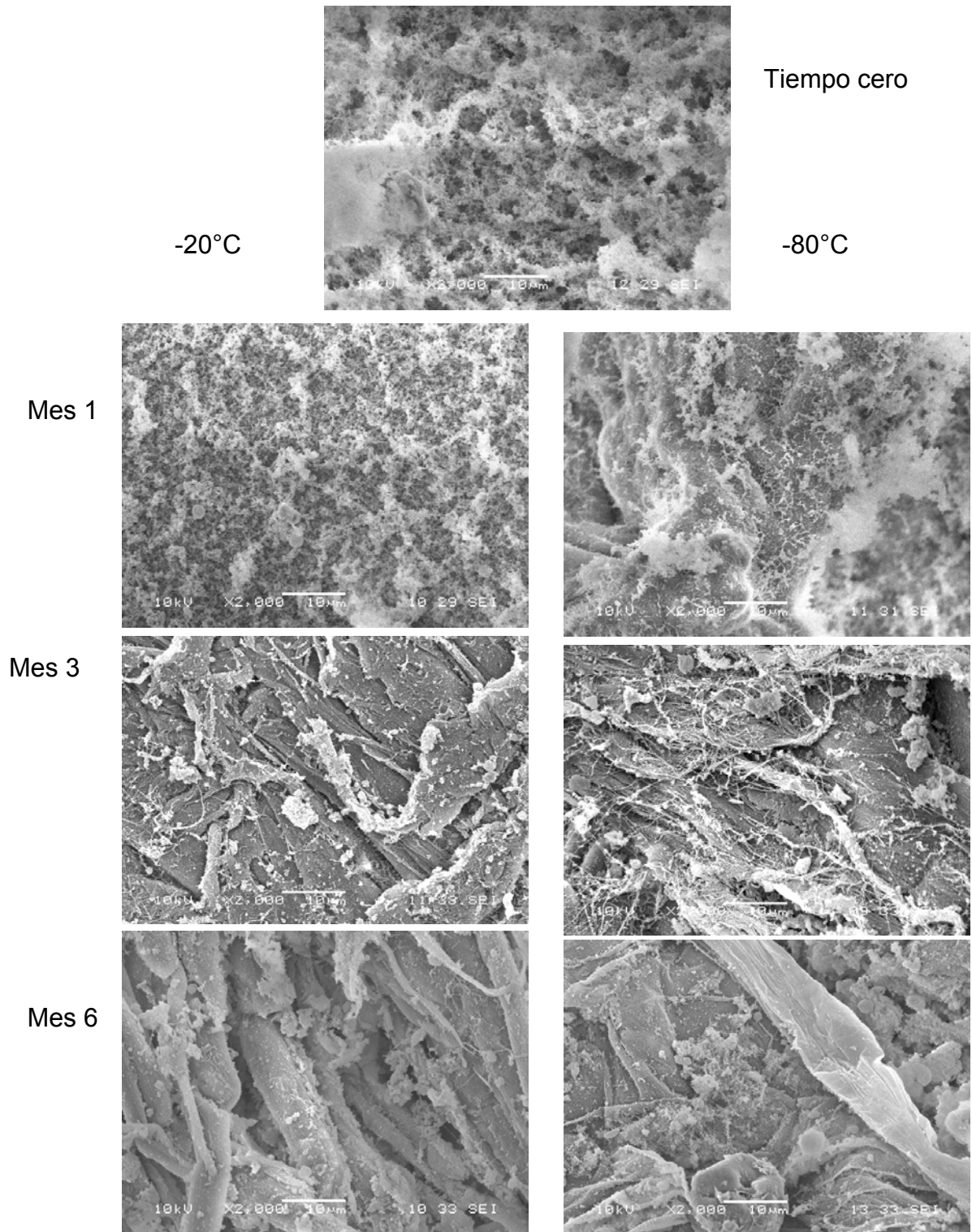
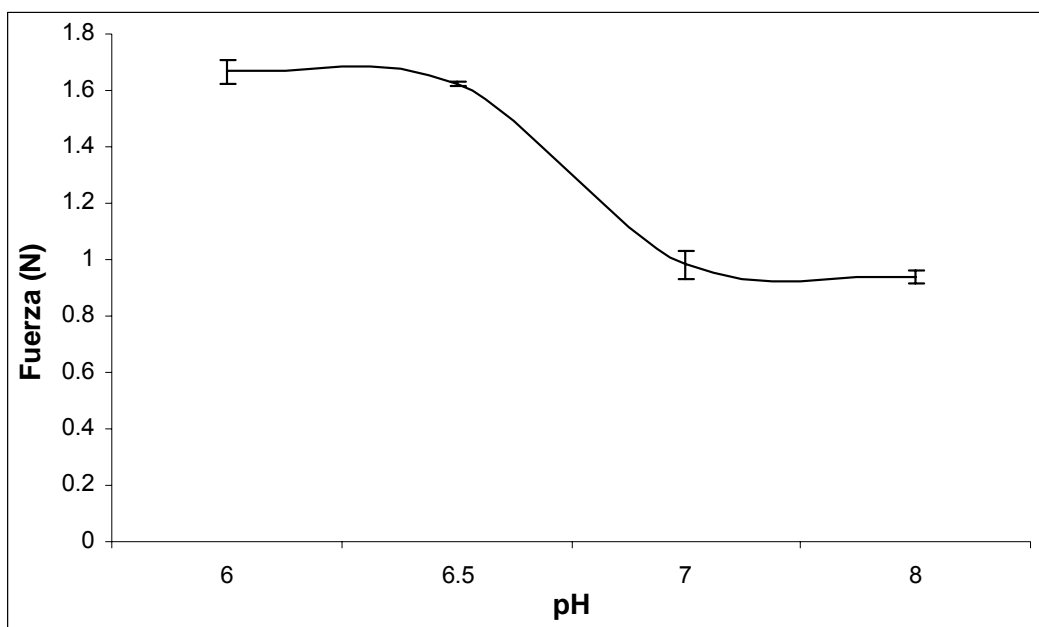


Figura 7. Micrográficas del manto del calamar gigante almacenado en congelación a -20°C y -80°C . Aumento 2000x.

7.9 Propiedades de gelificación

Para estudiar las propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar gigante, se llevó a cabo la gelificación térmica de éstas. Se realizaron estudios previos para determinar el pH óptimo de gelificación, la velocidad de penetración y el porcentaje de penetración. La mayor fuerza de gelificación se observa en la gráfica 15, a pH de 6 ($p < 0.001$) (Tabla 2). Lan y col. (1995b y 1995c) reportaron que la fuerza de penetración de geles está influenciada por el pH, encontrando el valor óptimo entre 6.0 y 6.5

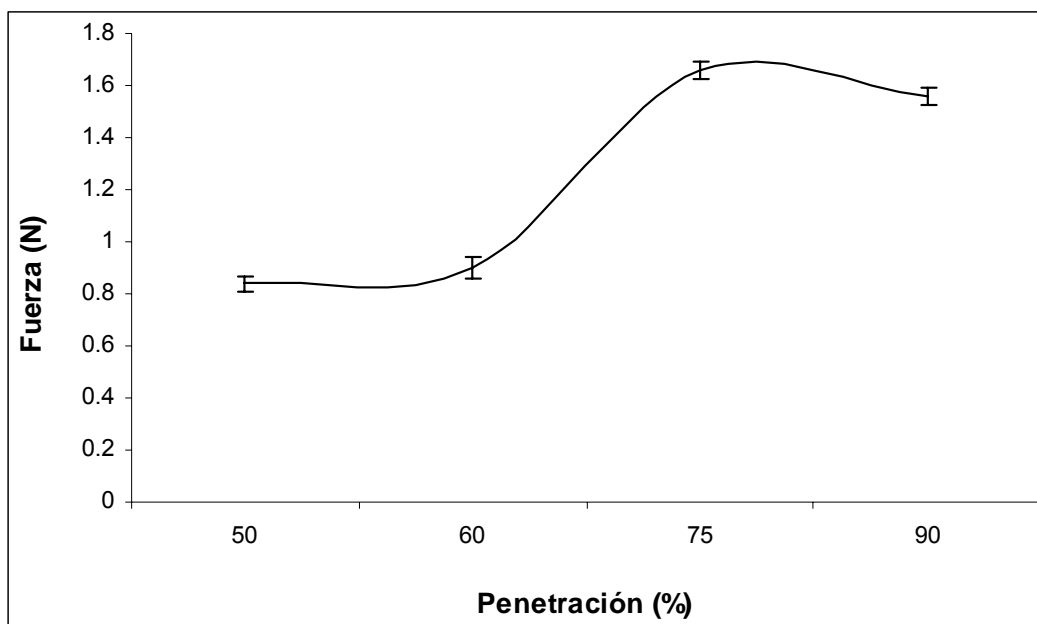


Gráfica 15 Efecto del pH en la fuerza del gel de proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Tabla 2. Comparación de medias mediante el método de Duncan del efecto del pH sobre la fuerza de gelificación.

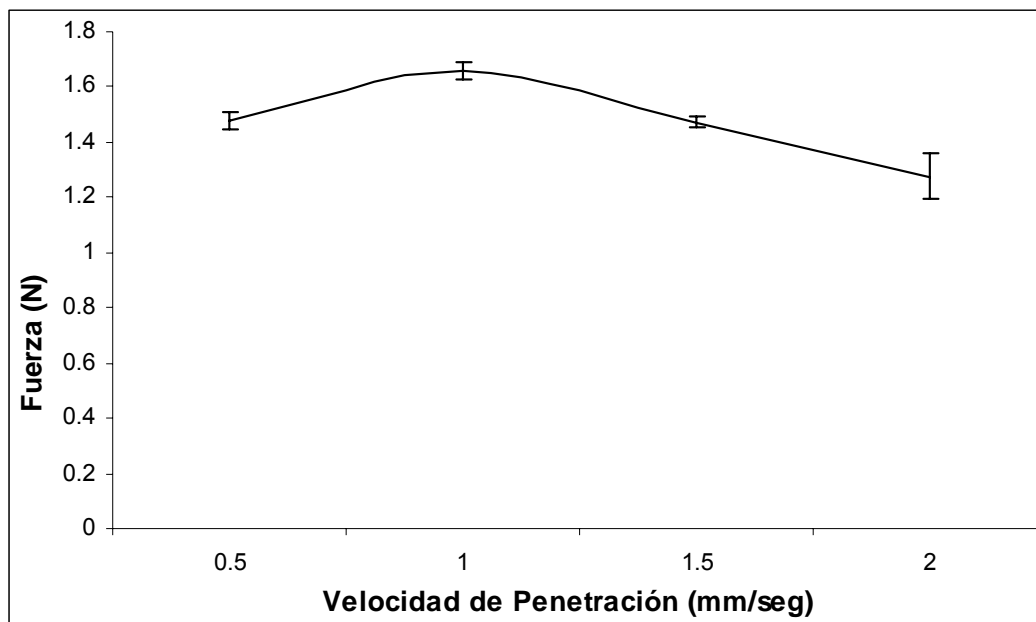
pH	Grupos			
	1	2	3	4
8	.9393			
7		.9818		
6.5			1.6234	
6				1.6679

Una vez determinado el pH de gelificación, se realizaron pruebas para obtener el porcentaje de penetración, tomando un intervalo de 50-90%, en donde se puede observar que a 75 % se obtuvo la mayor fuerza de gel (Gráfica 16).



Gráfica 16. Efecto de la penetración en la fuerza del gel de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

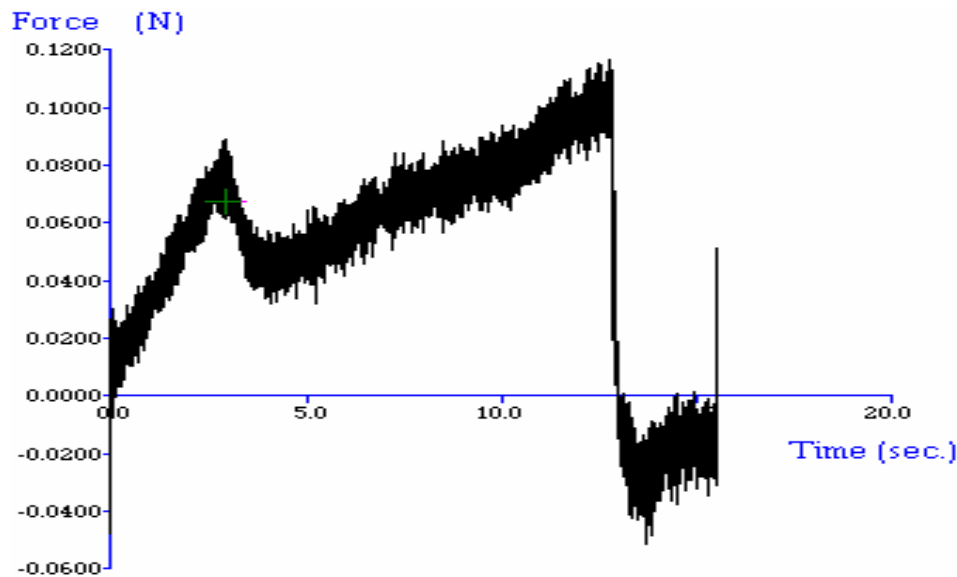
La velocidad con la cual penetra el émbolo en el gel formado, fue determinada en un intervalo de 0.5-2 mm/seg, encontrándose que la velocidad óptima de penetración fue de 1 mm/seg (Gráfica 17).



Gráfica 17. Efecto de la velocidad de penetración en la fuerza del gel de proteínas miofibrilares del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Los valores de estos parámetros determinados, se observan en la Gráfica 18, en donde se obtuvo el trabajo total o área bajo la curva, expresado en Newtons/s.

Fuerza (N)



Gráfica 18. Trabajo total de la fuerza de gel de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Con los parámetros encontrados se determinó la fuerza del gel formado por las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar gigante, almacenado a 4°C, –20°C y –80 °C.

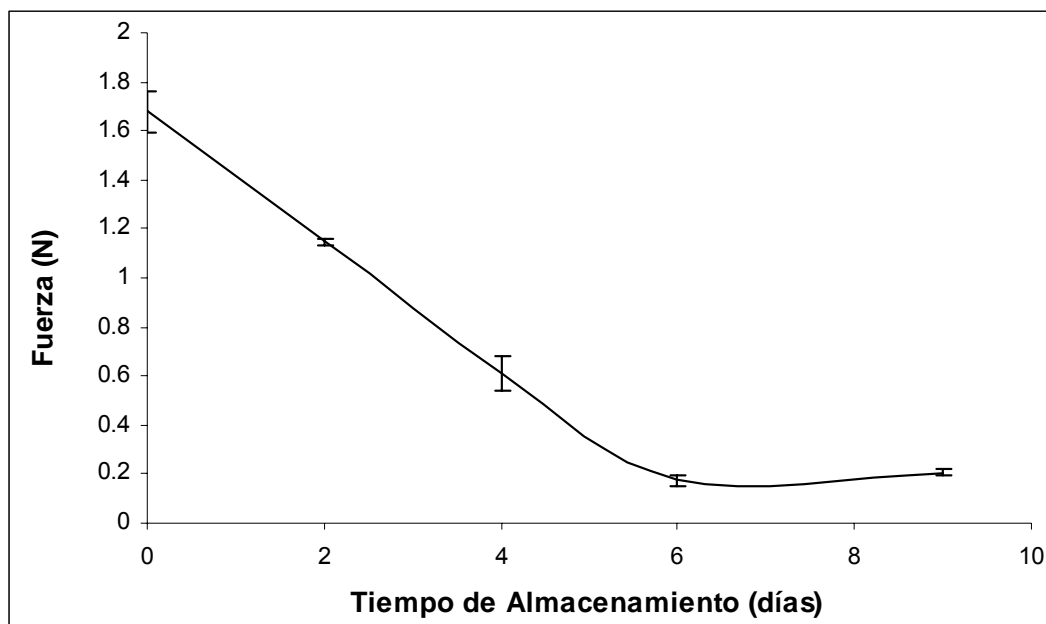
El progreso de desnaturalización de la miosina es muy complejo, cada transición térmica está asociada con una región determinada de la molécula; debido a esto, el proceso de desnaturalización es interpretado en términos de las diferentes estabilidades térmicas intrínsecas en cada región: la porción de la cola de la miosina es el principal subfragmento asociado con la gelificación. La meromiosina ligera y el subfragmento S1 son los responsables de la desnaturalización y la agregación térmica a temperaturas por debajo de 55 °C, mientras que el subfragmento S2 se desnaturaliza y agrega por

encima de esta temperatura (Sano y col., 1990a; Sano y col., 1990b; Chan y col., 1993; Tazawa y col., 2002).

La formación de puentes disulfuro S-S en la región S1 de la miosina, contribuye a la creación de una matriz tridimensional en un intervalo de 45-55 °C (Samejima y col., 1981), debido posiblemente a que la cabeza globular posee 12 o 13 de los 42 grupos tioles (SH) presentes en la molécula de miosina (Smyth y col., 1998). Arriba de los 55 °C, los enlaces disulfuro son menos importantes para la gelificación de la miosina. Probablemente la cola de la miosina (meromiosina ligera y S2) es la responsable de la formación del gel a estas temperaturas, por interacciones hidrofóbicas y puentes de H (Smyth y col., 1998; Visessanguan y col., 2000).

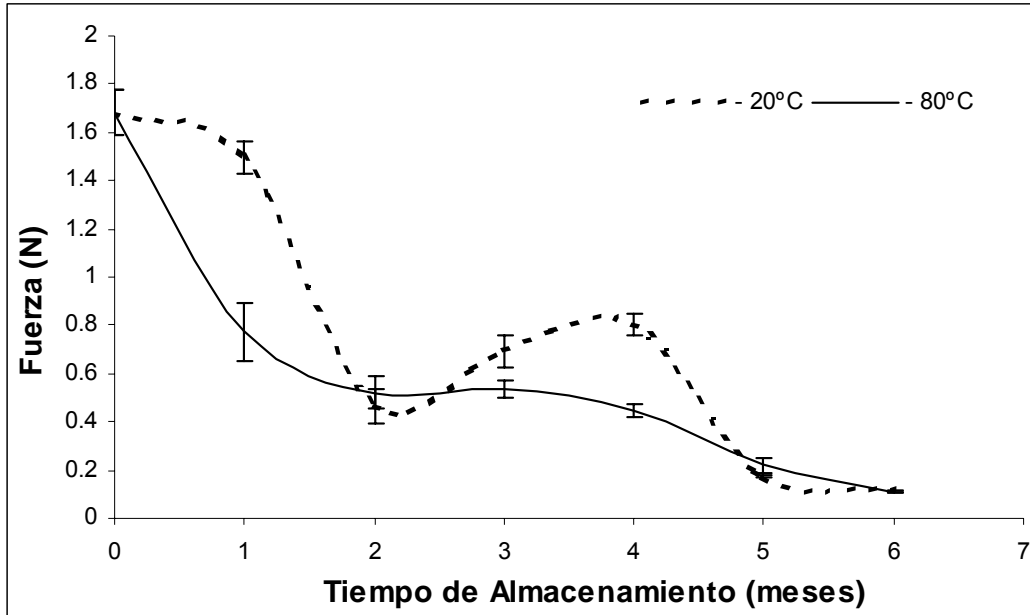
En la Gráfica 19, se observa que los geles obtenidos con las proteínas almacenadas a 4°C, fue perdiendo su fuerza al transcurrir el tiempo de almacenamiento, ya que como se observó en el gel de electroforesis (Figura 4), la miosina había sido degradada en su totalidad, y como se sabe, la miosina tiene un papel fundamental en la textura y en la formación de geles inducidos por calor, debido a la agregación irreversible de las cabezas de miosina que forman una red tridimensional (Pérez y col., 2000). El desplegamiento gradual de las subunidades de la miosina permite que cada dominio estructural actúe de manera cooperativa, para la formación de una red tridimensional que conforma el gel. La degradación de esta importante molécula durante el almacenamiento reduce la capacidad de gelificación. Un fenómeno similar se observó en los geles obtenidos con las proteínas miofibrilares de muestras

almacenadas a -20 y -80°C , en donde se observó que la fuerza de gel disminuyó durante el almacenamiento, en ambos casos, esto pudo ser debido a que la miosina se va degradando paulatinamente, con lo cual las interacciones en la red tridimensional pudieron haber disminuido, teniéndose una fuerza menor, siendo este fenómeno más evidente durante el almacenamiento en refrigeración; sin embargo, la pérdida de la capacidad de gelificación se podría deber también a un fenómeno de agregación y desnaturalización.



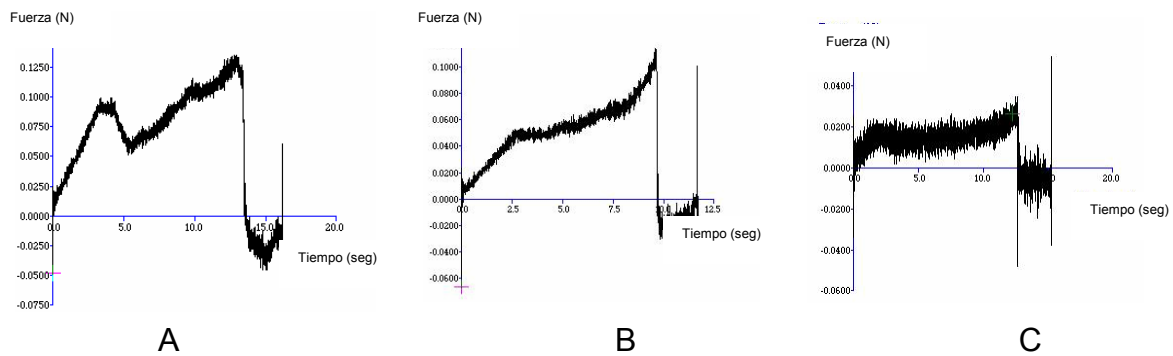
Gráfica 19. Efecto del almacenamiento a 4°C en la fuerza de gelificación de las proteínas miofibrilares del calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

En la Gráfica 20, se muestra el efecto del almacenamiento sobre la fuerza de gelificación durante el almacenamiento a -20 y -80 °C, donde se observa una disminución paulatina de la fuerza del gel.



Gráfica 20. Efecto del almacenamiento a -20 y -80 °C en la fuerza de gelificación de las proteínas miofibrilares.

En la Gráfica 21, se observa las gráficas de diferentes muestras de gel, obtenidos a partir de las proteínas miofibrilares almacenadas a 4 °C, observándose que al transcurrir este tiempo de almacenamiento la fuerza disminuyó, formándose una meseta, lo cual indicó que la estructura del gel dejó de ser constante en el tiempo de estudio. Un comportamiento similar se observó con las proteínas almacenadas a -20 y -80 °C.



Gráfica 21. Efecto del almacenamiento en la fuerza de gelificación de las proteínas miofibrilares durante el periodo de almacenamiento a 4°C. (A): Tiempo 0 de almacenamiento, (B): 4 días de almacenamiento, (C): 9 días de almacenamiento.

7.10 Estudios reológicos dinámicos

Mediante análisis reológicos dinámicos, se puede determinar el comportamiento del módulo de almacenamiento (G'), G'' , $\tan \delta$ debido probablemente a las alteraciones en las cinéticas de desnaturalización y agregación, que son parte fundamental del mecanismo de gelificación (Samejima y col., 1985; Liu y Xiong 1997).

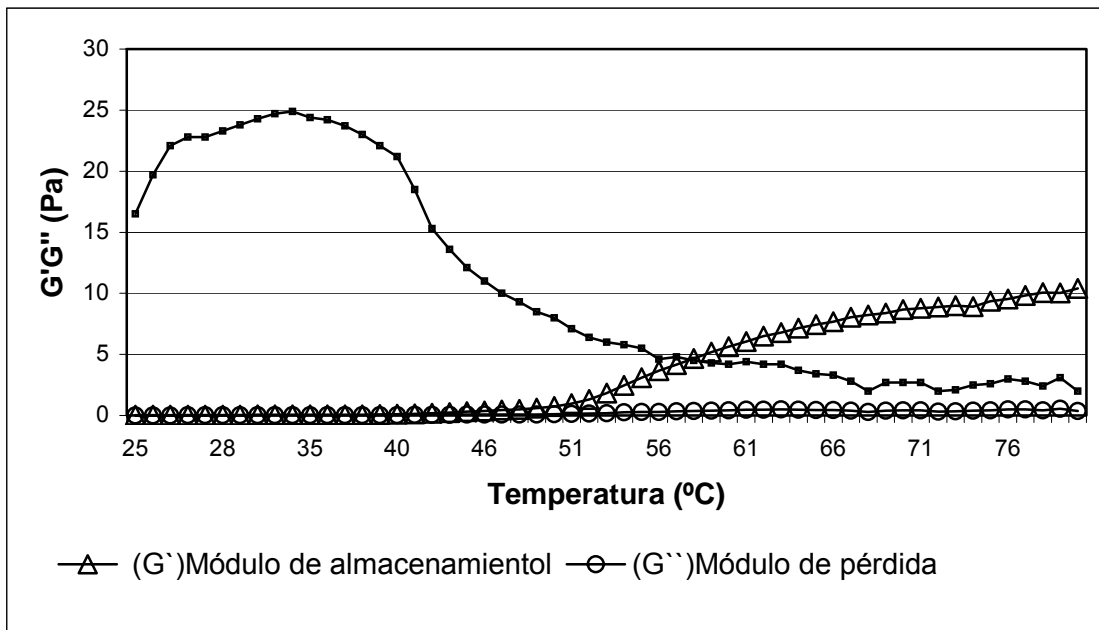
A una velocidad dada de desnaturalización, cuantas más pequeñas sean las fuerzas de atracción entre las cadenas de proteína desnaturalizada, más lento será el segundo proceso. De esta forma, la proteína desnaturalizada libre se acumulará como un intermediario en el curso de la gelificación y se obtendrá una red de gel más fina (Ziegler y Acton, 1984; Liu y col., 1996). El módulo de almacenamiento (G') es un índice de la rigidez del material, así como de la elasticidad del mismo (Barbut y Mital, 1990). Para determinar si predomina la elasticidad de los geles se utiliza el cociente entre el módulo de pérdida y el módulo de almacenamiento ($G''/G'=\tan \delta$). Este término

representa cuánta energía es almacenada y recuperada en cada ciclo de deformación (componente G'), y cuánta energía se pierde en cada ciclo por disipación viscosa (componente G'') (Stanley y col., 1996). Para un cuerpo perfectamente elástico el esfuerzo está en fase con la deformación ($\delta = 0^\circ$), por lo que toda la energía es almacenada y recuperada. Para un cuerpo perfectamente viscoso (Newtoniano), el esfuerzo está totalmente fuera de fase y toda la energía se disipa viscosamente ($\delta = 90^\circ$) (Stanley y col., 1996; Visessanguan y An., 2000).

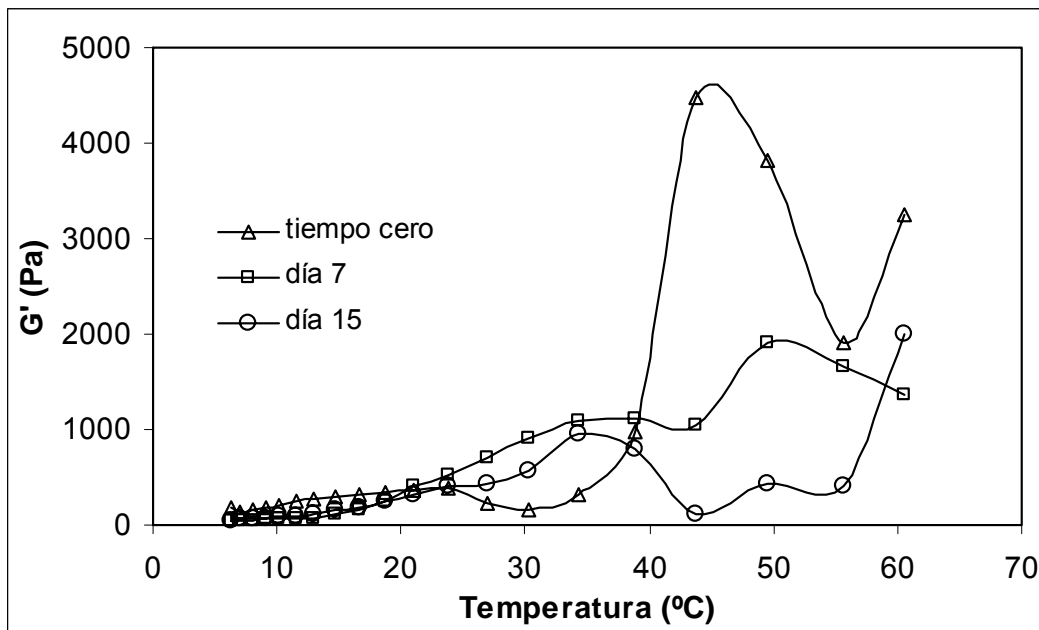
En los intervalos lineales en donde, componentes elástica y viscosa se mantienen constantes (región viscoelástica lineal), de aquí se tomaron los valores para llevar a cabo los experimentos de oscilación de frecuencia. Estos parámetros que son: esfuerzo oscilatorio de frecuencia (Hz) y un esfuerzo máximo (Pa). Con éstos parámetros las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar gigante, se sometieron a la gelificación térmica.

En la Gráfica 22, se muestran los cambios en módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y ángulo de fase (δ), que se observaron durante el tratamiento térmico del homogeneizado del músculo del calamar. Esto es un punto de gelificación típico del músculo de los cefalópodos y ha sido reportado en otras especies de calamar (Gómez y col., 2002), donde G' alcanza un mínimo a 35-40 °C. También es la temperatura a la cual el ángulo de fase es mayor, indicando la prevalencia sobre la componente viscosa (G'') la componente elástica, la cual es mínima a esta temperatura. En la Gráfica 22, se puede observar que G' disminuyó en función del tiempo de almacenamiento, lo cual podría indicar la posible hidrólisis y/o desnaturalización de las proteínas miofibrilares, principalmente de la miosina, la cual es una de las principales

proteínas responsables de la formación de redes proteicas, esto ocasionando una disminución en la fuerza de gel, debido probablemente por la actividad proteolítica durante el estudio, así como por el proceso mismo de congelación.



Gráfica 22. Comportamiento de los parámetros dinámicos durante el tratamiento térmico del homogeneizado del músculo del calamar.



Gráfica 23. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') en función de la temperatura del manto de calamar gigante almacenado a 4°C .

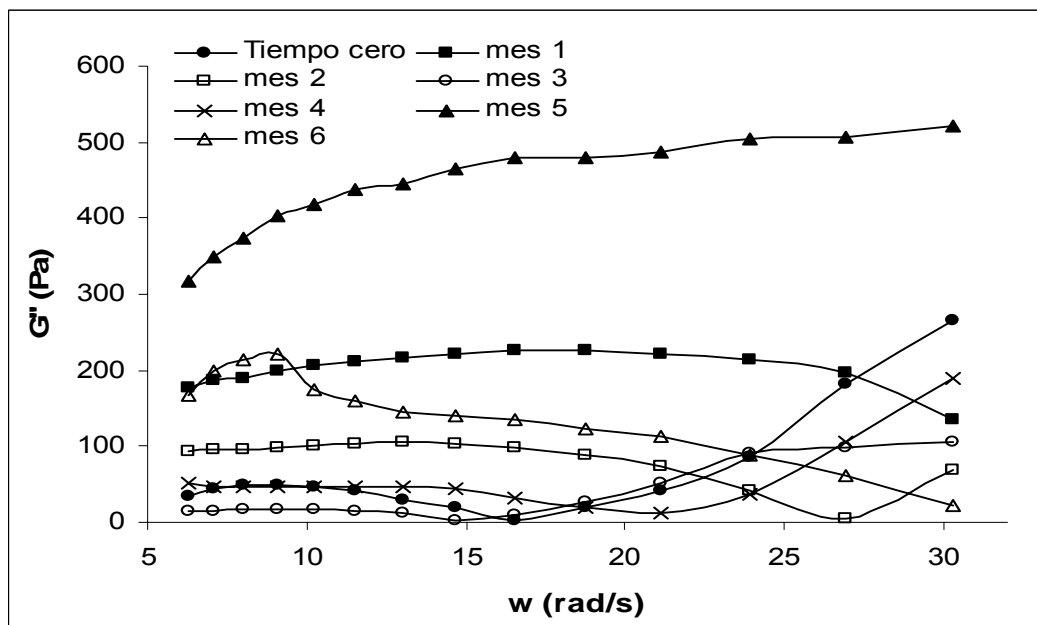
La estructura intacta de la miosina permite que cada dominio estructural se desnaturalice paso a paso y refleje la naturaleza cooperativa de la transición desde su conformación nativa hasta un estado menos estructurado durante la gelificación inducida por calor (Visessanguan y An, 2000). En base a esto, es posible suponer que el pH generó cambios en las proteínas miofibrilares que alteraron sus características al desnaturalizarse, así como modificaciones en la interacción proteína-proteína durante la agregación, por ejemplo temperatura y tasa de desnaturalización, que determinan los parámetros reológicos. Durante el periodo de almacenamiento en refrigeración, puede decirse que las modificaciones en las propiedades de gelificación de las proteínas miofibrilares pueden ser explicadas por un proceso de proteólisis, ya que en la muestra que se almacenó a 4°C la miosina fue completamente hidrolizada. Después del calentamiento un complejo proteico como la miosina sufre múltiples cambios

conformacionales, atribuibles a las diferentes estabilizaciones térmicas dentro de los diversos dominios estructurales. Al tener hidrólisis en esta proteína, se generan redes proteicas con diferentes estructuras y texturas así como, diferente rigidez en el gel. El proceso de desdoblamiento debe ocurrir primero, para desarrollar un gel con un alto grado de elasticidad, y por lo tanto el paso de agregación debe proceder más lentamente que el paso de desplegamiento para permitir la desnaturalización de las proteínas y la orientación sobre sí mismas, e interactuar en puntos específicos formando una red tridimensional estructurada (Xiong, 1994).

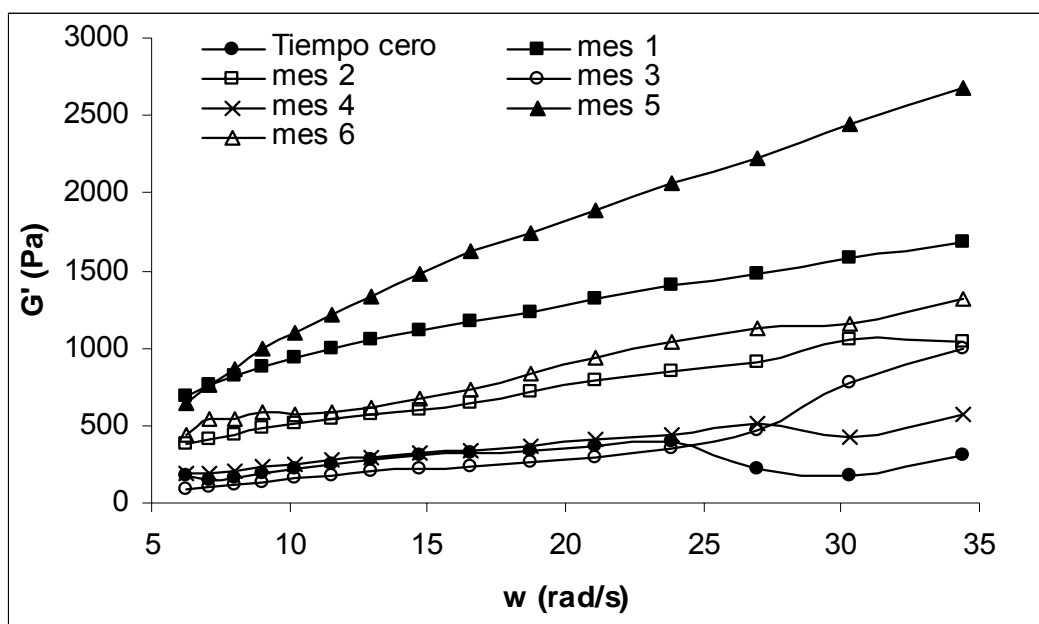
Al llevar a cabo el análisis reológicos dinámicos, durante el periodo de almacenamiento en congelación, se observó que el módulo de almacenamiento G' fue aumentando al aumentar la frecuencia (ω); sin embargo, este proceso fue independiente del tiempo de almacenamiento, pues aparentemente no se observó una tendencia definida durante éste. La frecuencia pudo inducir un rompimiento de las proteínas, al haber un aumento en el rompimiento de éstas, se puede ocasionar una disminución en G' (Gráficas 24 y 25), y por consecuencia un aumento en G'' (Gráficas 26 y 27), dando como resultado un aumento de interacciones entre los nuevos fragmentos de proteína, ocurriendo esto de manera sucesiva; es decir, llevándose a cabo éste efecto en ciclos consecutivos, ya que al ir transcurriendo el periodo de almacenamiento, G' disminuye para posteriormente aumentar, y así sucesivamente hasta completar 6 meses, provocando cambios en la estructura proteica, favoreciéndose con esto nuevas interacciones. En función de la frecuencia, se sabe que de la relación $G''/G' = \delta$, cuando $\delta > 1$ se favorece la componente viscosa y cuando $\delta < 1$ predomina la componente elástica. Sin embargo, durante el periodo de

almacenamiento, en la relación $G''/G' = \delta$ en función de la frecuencia, δ disminuyó, dándose como resultado un estado degradado de la proteína. En base a esto es posible suponer, que durante el periodo de almacenamiento en congelación, tanto el pH, la presencia de formaldehído, el proceso mismo de congelación, así como al proceso de proteólisis, provocaron cambios en las proteínas miofibrilares, promoviendo de ésta manera nuevas interacciones (hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro y enlaces proteína-formaldehído).

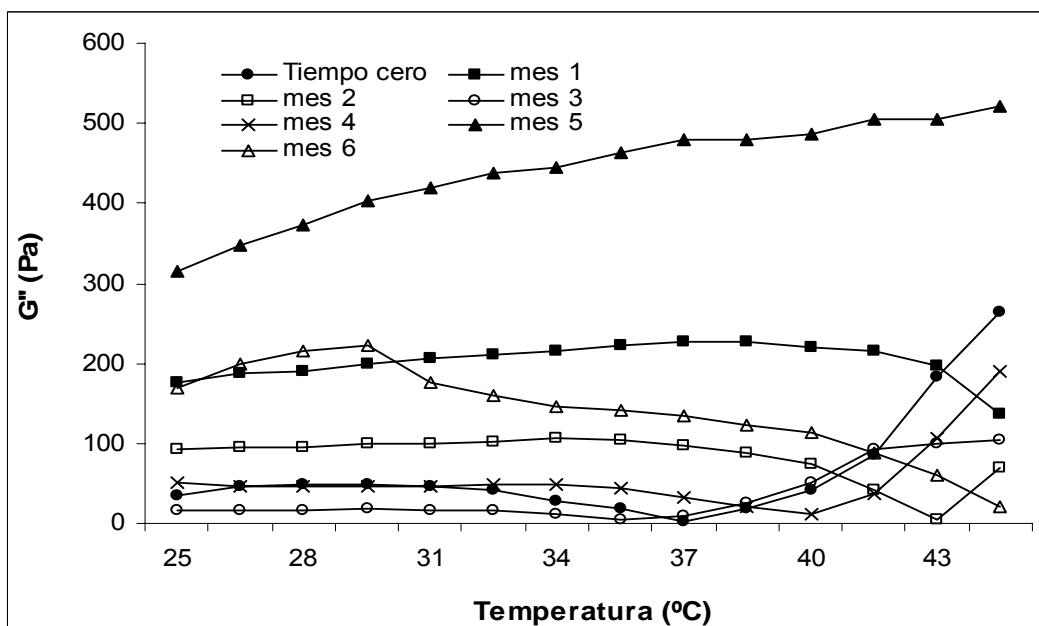
A pesar de que existe una variación grande en G'' , los cambios en fluidez no son tan dependientes de la frecuencia y con el tiempo de almacenamiento.



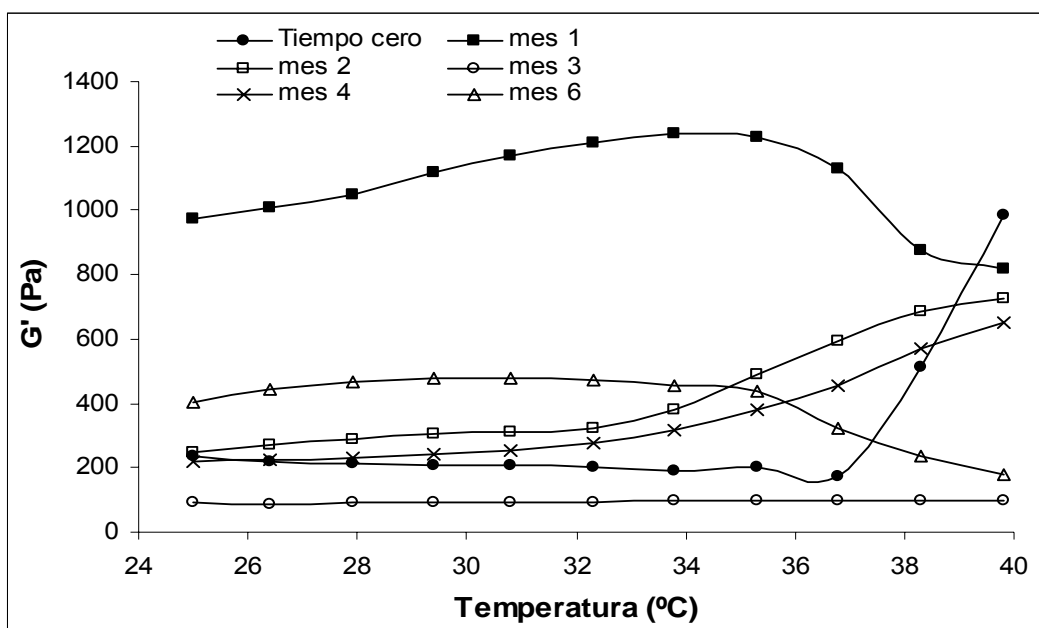
Gráfica 24. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en congelación a -20°C .



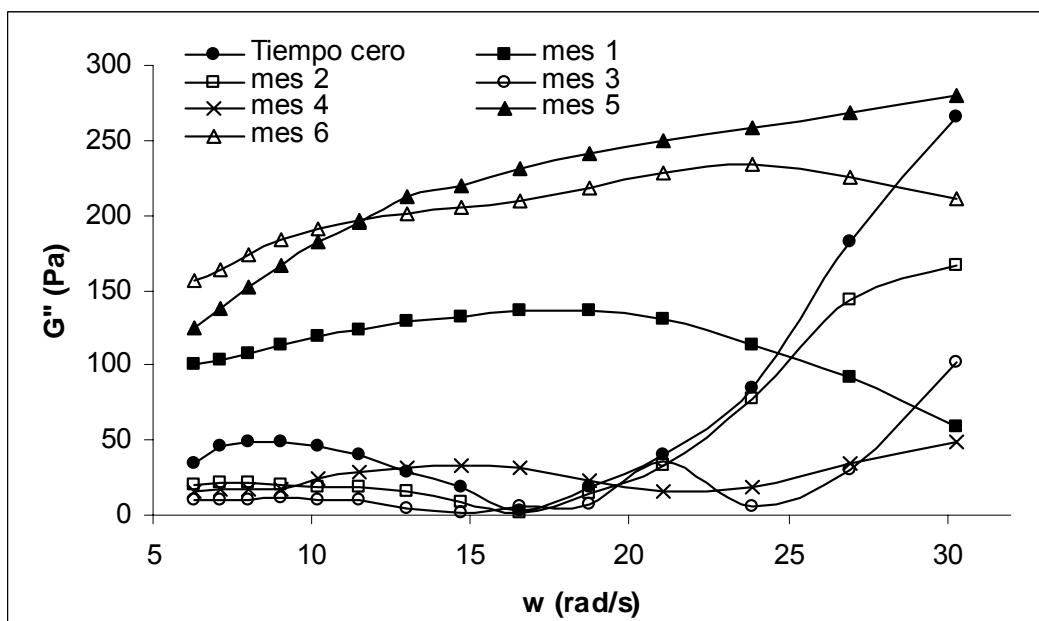
Gráfica 25. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en congelación a -20°C .



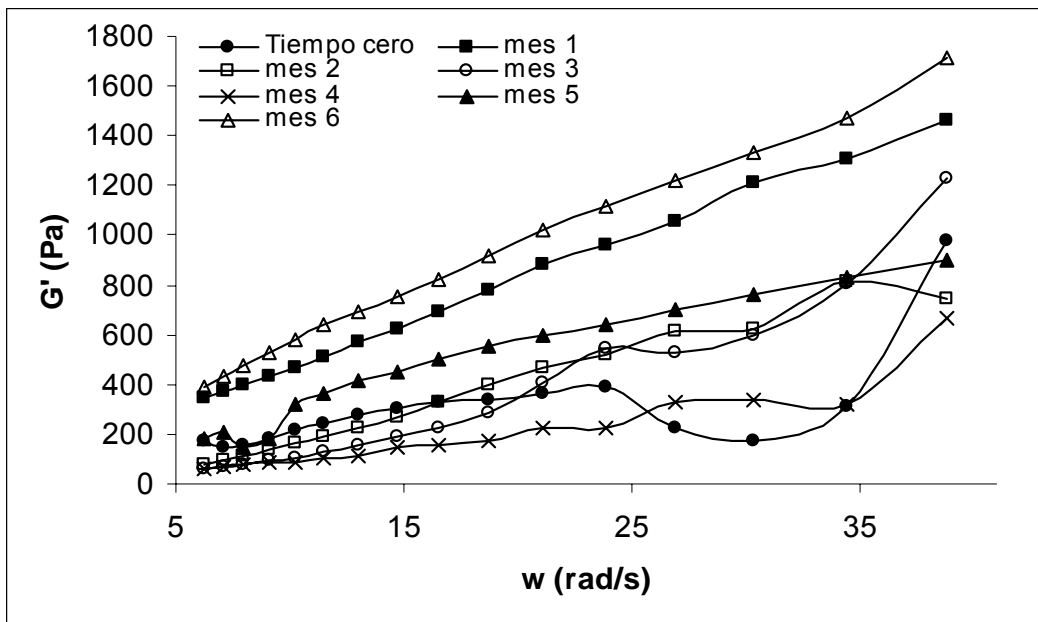
Gráfica 26. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -20°C .



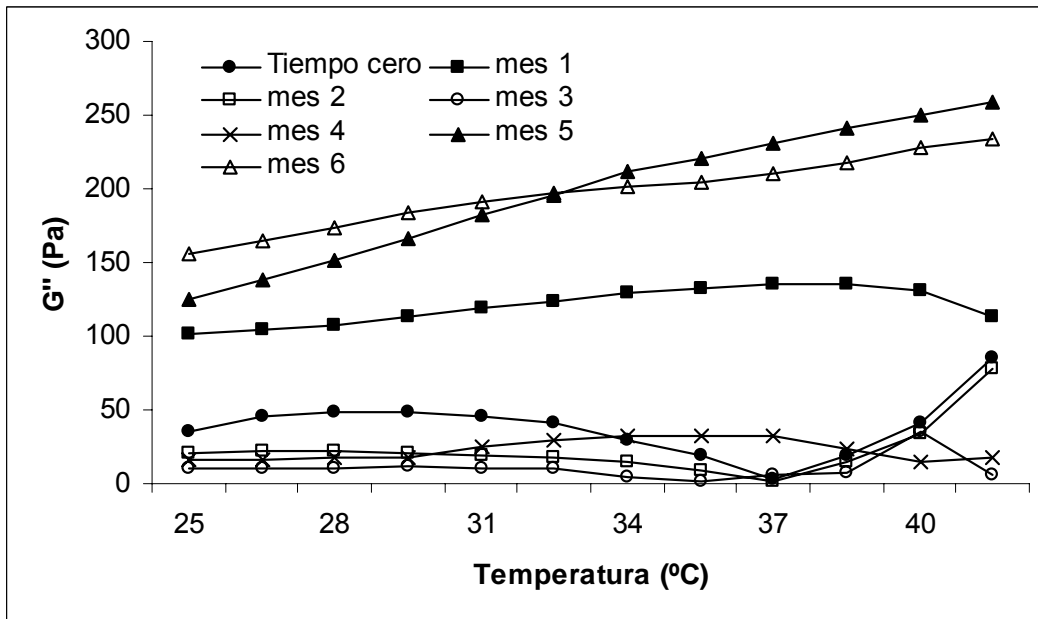
Gráfica 27. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -20°C .



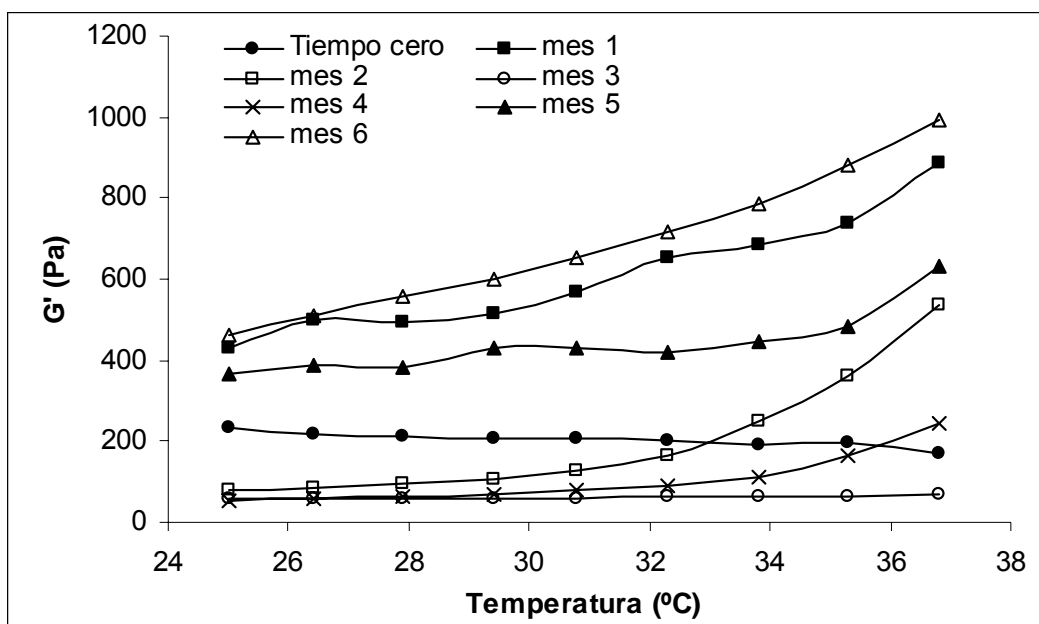
Gráfica 28. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -80°C .



Gráfica 29. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -80°C .



Gráfica 30. Comportamiento del módulo de pérdida (G'') de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -80°C .



Gráfica 31. Comportamiento del módulo de almacenamiento (G') en función de la temperatura, de proteínas miofibrilares del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -80°C .

7.11 Resumen de resultados:

- Al mantener el manto del calamar almacenado en congelación no se pierde la actividad de las proteasas presentes, por lo cual éstas pueden modificar tanto las propiedades estructurales como las reológicas, durante el almacenamiento y el procesamiento posterior.
- Las principales proteínas miofibrilares afectadas durante el periodo de almacenamiento a bajas temperaturas, fueron la miosina y la paramiosina.
- En el músculo del calamar gigante almacenado a 4°C, el pH aumentó debido a la formación de compuestos aminados.
- La CRA se mantuvo constante durante el periodo de almacenamiento en refrigeración y congelación, sin embargo, hubo cambios fisicoquímicos del músculo del calamar gigante.
- La solubilidad aumentó en la primer parte del almacenamiento; esto puede ser debido a que se inició la degradación de las proteínas musculares, y exposición de grupos hidrofílicos. En la segunda parte del almacenamiento, la solubilidad y la proteína disminuyeron, posiblemente a la degradación del TMAO a DMA y FA, presentándose la formación de agregados, como consecuencia se obtiene una disminución de la solubilidad.

- Los valores de FA por arriba de 6.5 mg/100g, probablemente indican que los cambios fisicoquímicos de las proteínas se han iniciado, ocasionando la desnaturalización de las proteínas del músculo de calamar almacenado a 4°C.
- Los valores de FA en el calamar almacenado a -20 y -80 °C, estuvieron por debajo de 6.5 mg/100g. Sin embargo, las cantidades presentes, pueden ocasionar el inicio del proceso de agregación.
- Los grupos sulfhidrilos disminuyeron durante el almacenamiento, debido a un cambio en la estructura terciaria de las proteínas. Esto causó la formación de enlaces disulfuros.
- En el perfil electroforético se observó la degradación de las proteínas miofibrilares principalmente la miosina y la paramiosina durante el almacenamiento a 4°C.
- Durante el almacenamiento a -20°C y -80 °C, no se observó una marcada degradación de las principales proteínas miofibrilares; sin embargo, se presentó la aparición de proteínas de bajo peso molecular, lo que indica el inicio de la degradación de estas proteínas y cambios en la solubilidad.

- Los parámetros para determinar la fuerza de gel fueron:
 - o pH = 6,
 - o Porcentaje de penetración = 75 %,
 - o velocidad de penetración = 1mm/seg.

- El efecto del almacenamiento sobre la fuerza del gel obtenido con proteínas miofibrilares almacenadas tanto a 4, como a -20 y -80°C, se vio modificada, debido a la desnaturalización de las principales proteínas miofibrilares como la miosina, paramiosina y actomiosina, proteínas responsables de la textura y propiedades reológicas.

Conclusiones

8. Conclusiones

En este estudio se determinó el efecto del almacenamiento en refrigeración y congelación sobre la funcionalidad y estructura del tejido muscular del manto del calamar gigante (*Dosidicus gigas*), la actividad proteolítica disminuye gradualmente durante el almacenamiento en congelación. Una serie de reacciones secundarias provocaron cambios en la estructura del calamar gigante y en la funcionalidad de éste, teniéndose como resultado la disminución en la capacidad de gelificación de las proteínas. A $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, los efectos por congelación e hidrólisis fueron menos evidentes que a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo la miosina una de las proteínas más susceptibles a la alteración.

Durante el almacenamiento a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, la actividad proteolítica provocó la hidrólisis de las proteínas miofibrilares, degradando principalmente a la miosina. Para -20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, la actividad proteolítica disminuyó; sin embargo, provocó a la hidrólisis de las proteínas miofibrilares, obtuviéndose proteínas de bajo peso molecular.

El almacenamiento a -80°C generó un mayor deterioro en el tejido muscular del calamar con reducción en la solubilidad de proteínas, capacidad de gelificación, mayor concentración de FA y formación de agregados proteicos. Los agregados proteicos se deben probablemente a la formación de interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro y enlaces proteína-formaldehído, al haber una menor cantidad de agua líquida.

El estudio en MEB mostró que la estructura del manto del calamar, se vió más afectada a temperaturas de almacenamiento de 4 y -80°C .

El almacenamiento a -20°C genera menor cambio en las proteínas miofibrilares, conservando sus propiedades funcionales y prolongando la vida útil del producto.

Durante el periodo de almacenamiento G' alcanza un mínimo a $35-40^{\circ}\text{C}$, teniéndose un ángulo de fase mayor donde se observa la prevalencia de la componente viscosa G'' sobre la componente elástica.

Con estos resultados, se puede generar conocimientos referente al manejo adecuado de esta especie. Sin embargo, es necesario realizar más estudios, haciendo una combinación de nuevas tecnologías para observar su comportamiento bajo estas condiciones de almacenamiento, como puede ser el uso de altas presiones, calentamiento ohmico, crioprotectores, además de la adición de inhibidores como citrato, tartrato y gluconato de sodio, para coadyuvar a prolongar la vida de anaquel de este producto.

Bibliografía

9. Bibliografía

- Alarcón, R. A. y Dransfield, E. 1990. Acceleration of proteolysis in beef by addition of calcium ions. Proceedings 36th. International conference of meat and technology. La Habana, Cuba. pp 179-185.
- Almadal, K., Dyre, J., Hvidt, S., y Kramer, O. (1993). Towards a phenomenological definition of the term gel. Polymer gels networks. 1, p.p. 5-17.
- Alvarez, M. D., Canet, W. Luesta, F. y Lamea, M. 1998. Viscoelastic characterization of solid foods from creep compliance data: application to potato tissues. Z Lebensm Unter Forsch A. 207:356-362.
- Análisis de Mercado, 2003. Fuentes: Secretaría de Economía (México); Departamento de Comercio (EUA); China Customs (China); Japan Customs (Japón) y Taiwan Directorate General of Customs (Taiwán) y Fishery Market News.
- Analytical Methods Committee (AMC) of the Royal Society of Chemistry in 1979. Analyst 104:434.
- Ancin, C., Sánchez, M. J. M., Villanueva, R. y Bello, J. 1989. Estudio de la actividad superficial de las proteínas cárnicas en pastas finas comerciales, como índice representativo de sus propiedades texturales. Anal. Bromatol. XLI (1):9-18.
- Ando, M., Tsukamasa, Y., Makinodan, Y., y Miyoshi, M. 1999. Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by freshness. J. Food Sci. 64:659-662.
- Anónimo, 1992. El calamar de México, una alternativa de producción. INP, Secretaría de la pesca, México, p 178.
- Anuario de pesca, 2003. <http://www.sagarpa.gob.mx>.
- Añon, M. C. y Jovanovich, G. 2000. Calorimetría diferencial de barrido. En Caracterización Funcional y estructural de proteínas. Pilosof, A.M.R y Bartholomai, G.B. editors. Edit. Ceudeba. CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) pp.97-126.
- Ashie, I. N. A. Simpson, B. K. y Ramaswam, Y. H. S. 1996 Control of endogenous enzyme activity in fish muscle by inhibitor and hydrostatic pressure using RMS. J. Food Sci. 61:350-356.

- Ashie, I. N. A. y Simpson, B. K. 1997 Proteolysis in food myosystem- A review. J. Food Biochem. 21:91-123.
- Ashie I. y Lanier T. 2000. Transglutaminasas in Seafood Processing, En Seafood Enzymes utilization and influence on Postharvest Seafood quality Editor Norman F. Haard y Benjamin K. Simpson. Edit Marcel Dekker, Nueva York. E.U.pp 147- 153.
- Barbut, S. 1994. Protein gel ultrastructure and functionality. En Hettiachchy, N.S. y Zieglet, G.R. Ed. Protein functionality in Food Systems.. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 383-434. ISBN 0-8247-9197-5.
- Barbut, S. y Mittal, G. S. 1990. Effect of heating rate on meat batter stability texture and gelation. J. Food Sci., 55:334-337.
- Barroso, M., Careche, M. y Borderías, A. J. 1998. Quality control of frozen fish using rheological techniques. Trends Food Sci. Tech. 9:223-229.
- Boyer, C., Joandel, S., Roussilhes, V., Culioli, J. y Ouali, A. 1996. Heatinduced gelation of myofibrillar proteins and myosin from fast- and slow-twitch rabbit muscle. J. Food Sci, 61: 1138-1 142, 1164.
- Burton, M. y Burton, R. 1979. Purnell's encyclopedia of animal. Edit. Bruguera. USA.
- Buttkus, H. 1970. Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. J. Food Sci. 35, 558.
- Camou, J. P., Sebranek, J. G. y Olson, D. G. 1989. Effect of heating rate and protein concentration on gel strength and water loss of muscle protein gels. J. Food Sci., 54:850-854.
- Carballo, B. y López De T. 2001. Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Edit. Madrid Vicente, España. pp 1-60.
- Careche, M., Herrero, A. M., Rodríguez-Casado, A., Del Mazo, M. L., y Carmona, P. 1999. Structural changes of hake (*Merluccius merluccius L.*) fillets: effects of freezing and frozen storage. J. Agric. Food Chem. 46, 952-959.
- Cassens, R. G., 1994 La estructura del músculo. En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Zaragoza, España. Editor James F. Price. Editorial Acribia pp 11-55.
- Castellanos C. C. y Hernández R. G. 2005 Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo del calamar Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

- Chan, J. K., Gill, T. A. y Paulson, A. T. 1993 Thermal aggregation of myosin subfragments from cod and herring. *J. Food Sci.*, 58: 1057-1061, 1069.
- Chen, C. S., Hwang, D. C. y Jiang, S. T. 1989. Effect of storage temperature on the formation of Disulfides and denaturation of Milkfish myosin (*Chanos chanos*). *J. Agric. Food Chem.* 37:1228-1231.
- CIBNOR, 2003. Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería de calamar gigante. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Clark, A. H. 1991. Structural and mechanical properties of biopolymer. En food polymers, gels and colloids, Dickinson, E. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 322-338.
- Cofrades, B. S. 1994. Funcionalidad y características físico-químicas de actomiosina procedente de distintas especies. Influencia de la congelación y conservación en estado congelado. Tesis doctoral en Farmacia. Instituto Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Instituto del Frío (CSIC). Madrid.
- Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E. y Stromer, M. H. (1976). A Ca^{2+} Activated protease possibly involved in miofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochem.* 15:2159-2167.
- Damodaran, S. 1994. Structure-function relationship of food. En Hettiachchy, N.S. y Zieglet, G. R. Ed. Protein functionality in Food Systems. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 1-37. ISBN 0-8247-9 197-5
- De la Rosa, M., Silva, J. T., García, T. V. M. y García, P. S. 1992. El calamar una pesquería en desarrollo. CRIP Ensenada. Informe Técnico del Instituto Nacional de la Pesca (Inédito).
- Dransfiel, E., Etherington, D. J. y Taylor, M. A. J., 1992. Modelling *postmortem* tenderization enzyme change during storage of electrically stimulated and non-stimulated beef. *Meat Sci.* 31:75-84.
- Di Lisa, F., De Tullio, R., Salamino, F., Barbato, R., Melloni, E., Siloprandi, N., Schiaffino, S. y Pontremoli, S. 1995. Specific degradation of troponin T and I by m-calpain and its modulation by substrate phosphorylation. *J. Biochem.* 308:57-61.
- Dublán, G. O., Sepúlveda, J., Pérez, Ch. M. L., Guerrero, L. M I. y Ponce, A. E. 2001 Structural and textural changes in giant squid (*dosidicus gigas*) during storage in refrigeration Institute of Food Technology. New Orleans, Louisiana. Estados Unidos.

- Dublán, G. O., Hernández, R. G. Guerrero, L. M. I. y Ponce A. E. 2002 Changes in protein solubility during frozen storage of giant squid "*Dosidicus gigas*". Institute of Food Technology Anaheim, California Estados Unidos.
- Ebina, H., Nagashima, Y., Ishizaki, S. y Taguchi, T. 1995. Myosin heavy chain-degrading proteinase from spear squid muscle. Food Res. Intern. 28:31-36.
- Ehrhardt, N. M., Jacquemin, P. S., Solis, N. A., García, B. F., González, D. G., Ortiz, C. J. y Ulloa, R. P. 1982. Crecimiento del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. Ciencia pesquera 3:33-39.
- Ehrhardt, N. M., Solis, N. A., Jacquemin, P. S., Ortiz, C. J. Ulloa, R. P., González, D. G., García, B. F. 1986. Análisis de la biología y condiciones del stock del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980. Ciencia pesquera 5:63-76.
- Eileen, L. L. y Gill, T. A. 1982 Comparative study of proteolysis in short-finned (*Illex illecebrosus*) and long-finned (*Loligo peali lesur*) squid. Compl. Biochem. Physiol. 73B:201-210.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82:70-77.
- Etherington, D. J. 1984. The contribution of proteolytic enzymes to *postmortem* changes in muscle. J. Anim. Sci. 59:1644-1649.
- Flores, J. y Bermell, S. 1984. Capacidad de gelificación de las proteínas miofibrilares. Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment. 26:151-158
- Flores, J. y Bermell, S. 1986. Capacidad de gelificación de las proteínas miofibrilares. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 26:3 18-324.
- Foegeding, E. A., Allen, C. E. y Dayton, W. R. 1986. Effect of heating rate on thermally formed myosin, fibrinogen and albumin gels. J. Food Sci., 51: 104-108, 112.
- Fritz, J. D. y Greaser, M. L. 1991. Changes in titin and nebulin in *postmortem* bovine muscle revealed by gel electrophoresis, western blotting and immunofluorescence microscopy. J. Food Sci. 56:607-615.
- García, C. F. L., Dimes, L. E. y Haard, N. F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. Analytic. Biochem. 214, 65-69.
- Girard, J. P., 1991. I. La congelación. En: Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza España. pp 5-33.

- Gómez, G. C., Solas, T., Borderías, A. J., y Montero, P. 1996a. Ultraestructural and rheological changes during gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle. *Z. Lebensm-Unters-Forsh.* 202:215-220.
- Gómez, G. C., Borderías, A. J., y Montero, P. 1996b. Salt, nonmuscle proteins and hydrocollids affecting rigidity changes during gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*). *J. Agric. Food Chem.*45:616-621.
- Gómez, G. M.C., Hurtado, J., Montero, P. 2002 Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle. *J. Food Scie.* 67: 2491-2495
- Gornall A. J., Bardawill C. J., y David M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.
- Greaser, M. L. y Fritz, J. D. 1995. *Postmortem* changes in myofibrillar proteins in relation to meat texture. *Ecceamst.* pp 293-309.
- Gruda, Z., Postoloski, J. 1995. Introducción. En: Tecnología de la congelación de los alimentos. Zaragoza España. pp. 1-6.
- Hamm, R. 1975. Water holding capacity of meat. En *Meat*. Editores D. J. A. Cole y R. A. Lawrie. Butterworths. Londres, Reino Unido. pp 321-337.
- Hameed, K. S. and Haard, N. F. 1985. Isolation and characteritacion of cathepsin C from atlantic short finned squid *Illex illecebrosus*. *Compl. Biochem. Physiol.* 82B: 241-246.
- Herbard, C. E., Flick, G. J. y Martin, R. E., 1982. Occurrence and significance of trimethylamine oxide and its derivates in fish and shellfish. En: *Chemistri and Biochemistry of Marine Food Products*. Flick, G. J, Ward, D.R. y Martin, R.E. editores. AVI Publishing Co., Wesport, Conn., pp. 149-304.
- Hernández, H. A., Morales, E., Nevárez, M. O., Balmori, A. y Rivera, G. I. 1996. Distribución de tallas y aspectos reproductivos del calamar gigante (*Dosidicus gigas*, D'Orbigny, 1835) en el Golfo de California, México. *Ciencia pesquera* 12:85-89.
- Hickson, D. W. Dill, R. G., Morgan, V. E., Sweat, D. A. Suter y Carpenter, Z. L. 1982. Rheological properties of two heat-induced proteins gels. *J Food Sci.* 47:783-785,791.
- Hultin, H. O. 1993. Características del tejido muscular. En: *Química de los alimentos*. Director Fennema, O. R. Zaragoza España. pp 815-888.

- Hurtado, J. L., Borderías, J. y Montero, P. 1999. Characterization of proteolytic activity in octopus (*Octopus vulgaris*) arm muscle. J. Food Biochem. 23, 469-483.
- Ishioroshi, M., Samejima, K. y Yasui, T. 1979. Heat-Induced Gelation of Myosin: Factors of pH and Salt Concentrations. J. Food Sci., 44: 1280-1284.
- Jiang, S. T. Hwang, D. C. y Chen, C. S. 1988a. Denaturation and change in SH group of actomyosin from Milkfish (*Chanos*) during storage at -20°C . J. Agric. Food Chem. 36:433-437.
- Jiang, S. T. Hwang, D. C. y Chen, C. S. 1988b. Effecto of storage temperature on formation of disulfides and denaturation of Milkfish Actomyosin (*Chanos*). J. Food Sci. 53:1333-1335.
- Jimiénez-Colmenero, F., Careche, J., Carballo, J. y Cofrades, S. 1994. Influence of thermal treatment on gelation of actomyosin from different myosystems. J. Food Sci., 59: 211-215, 220.
- Kantha, S. S., Watanabe, S. y Hashimoto, K. 1990. Comparative biochemistry of paramyosin- a review. J. Food Biochem. 14, 61-88.
- Kamata, Y. Y Kinsella, J. E. 1998. A comparision of creep phenomena in food protein gel. J. Food Sci. 54:170-172.
- Klettner, P.G. 1995. Meat and meat products. Measuring texture and consistency with testing machines. Fleischwirtsch international, 36-36.
- Knipe, L. 1992. Phosphates as meat emulsion stabilizers. Phosphates as emulsifiers as, En Encyclopedia of food Science, Food Technology and nutrition. Academic Press Limited,. Londres, Reino Unido.
- Kolodziejska, I., Sikorski, Z. E. y Sadowska, M. 1987. Texture of cooked mantle of squid *Illex argentinus* as influence by specimen characteristics and treatments. J. Food Scie.52:932-935.
- Kolodziejska, I., Szyc, E., Marramac, M. y Sikorski, Z. E. 1994a Proteolytic activity of crude enzyme extract of squid *Illex argentinus* liver. J. Food Biochem. 18:43-53.
- Kolodziejska, I., Niecikowska, C. y Sikorski, Z.E. 1994b Dimethylamine and formaldehyde in cooked squid *Illex argentinus* muscle extract and mantle. Food Chem. 50:281-283.

- Kolodziejska, I., Marcinkowska, A. y Karamac, M. 1995. The proteolytic activity of the crude enzyme extracts of baltic cod (*Gadus morhua*) alimentary tract. J. Food Sci. Technol. 30, 159-166.
- Kolodziejska, I. y Sikorski, Z. E. 1996. Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates. A review. J. Food Biochem. 20, 349-363.
- Koohmaraie, M., Seideman, S. C., Scholmeyer, J. E., Dutson, T. R. y Babiker, A. S. 1988. Acceleration of *postmortem* tenderization in ovine carcasses through activation of Ca dependent proteases. J. Food Sci. 53:1638-1643.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor, general properties. J. Gen. Physiol. 30,291-310.
- Kuo, J. D., Hultin, H. O., Atallah, M. T. y Pan, B. S., 1991. Role of collagen and contractile elements in ultimate tensile strength of squid mantle. J. Agric. Food Chem. 39:1149-1154.
- Kuwahara K., Osako K. y Conno K. 2004. Improved gel formation of japanese common squid muscle as a result of supresión of autolysis by some organic salts. Nippon Suisan G., 70(6):922-927.
- Lan, Y. H., Novakofski, J., Mccusker, R. H., Brewer, M. S., Carr, T. R. y Mckeith, F. K. 1995a. Thermal gelation properties of protein fractions from pork and chicken breast muscle. J. Food Sci., 60:757-747,752.
- Lan, Y. H. Novakofski, J., Mccusker, R. H., Brewer, M. S., Carr, T. R. y Mckeith, F. K. 1995b. Thermal gelation of pork, beef, fish, chicken and turkey muscles as affected by heating rate and pH. J. Food Sci., 60:936-940,945.
- Lan, Y. H., Novakofski, J., Mccusker, R. H., Brewer, M. S., Carr, T. R. y Mckeith, F. K. 1995c. Thermal gelation of myofibrils from pork, beef, fish, chicken and turkey. J. Food Sci., 60:941-945.
- Lawrie, R. A. 1985. Pergamon Press Ltd. Headington Hill Hall. London. Meat Sci. pp 91-158.
- Lefevre, F., Fauconneau, B., Ouali. A. y Culioli, J. 1998. Thermal gelation of brown trout myofibrils: Effect of muscle type. heating rate and protein concentration. J. Food Sci., 63:299-3 04.
- Lindsay, R. C., 1993 Flavor. En: Química de los alimentos. Director Fennema, O. R. Zaragoza España. pp 659-707.
- López, L. R. F., 1984. Elaboración de un embutido tipo salchicha a base de calamar (*Dosidicus gigas*). Tesis Licenciatura Médico Veterinario Zootecnista. UNAM.

- Liu, M. N., Foegeding, E. A., Wang, S. F., Smith, D. M. y Davidian, M. 1996. Denaturation and aggregation of chicken myosin isoforms. *J. Agric. Food Chem.*, 44:1435- 1440.
- Liu, G. y Xiong, Y. L. 1997. Gelation of chicken muscle myofibrillar proteins treated with protease inhibitors and phosphates. *J. Agric. Food Chem.*, 45:3437-3442.
- Lu, R. y Chen, Y. 1999. Shear properties and Warner-Bratzler tenderness measurement of beef. *J. Text. Stdi.* 30:361-375.
- Marcotte, M., Hoshahili, A. R. T y Ramaswamy, H. S. 2001. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. *Food Res. Int.* 34:695-703.
- Matsumoto, J. J. 1980. Chemical deterioration of proteins. En *Amer Chem. Soc.*, Editor J. R. Whitaker y M. Fujimaki. Edit. ., ACS Symposium series., 123. pp. 95-124.
- Matsumura, Y. y Mori, T. 1996. Gelation. En Hall, G.M Ed., *Methods of Testing Protein Functionality*. 1ª. Edición. Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, p 76-109. ISBN O 7514 0053 X.
- Mettler-Toledo, 1998. Collected applications book. Thermal analysis. Suiza.
- Miura-Yokota K., Matsubara Y., Ebihara T., Hattori S., Irie S. 2004. A cysteine activated protease isolated from *Todarodes pacificus* squid degrades collagen below its denaturing temperatura. *Connective Tissue Reseach*, 45(2):109-121.
- Montero, P., Bordería, J. 1999. Effect of rigor mortis and ageing on collagen in trout (*Salmo irideus*) muscle. *J. Sci. Food Agric.* 52:141-170.
- Morita, J. I. y Ogata, T. 1991. Role of light chains in heat-induced gelation of skeletal muscle myosin. *J. Food Sci.*, 56:855-856.
- Nagashima, Y., Ebina, H., Nagai, T., Tanaka, M., y Taguchi, T. 1992 Proteolysis affects thermal gelation of squid mantle muscle. *J. Food Sci.* 57, 916-917/922.
- Nigmatullin, Ch. M., Nesis, K. N. y Arkhiokin, A. I. 2001. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (*Cephalopoda: Ommastrephidae*). *Fish. Research.* 54:9-19.
- Niwa, E. 1992, Chemistry of surimi gelation. En *Surimi Technology*. Nueva York. E.U. Editor. Tyre C. Lanier y Chong M. Lee. Edit Marcel Dekker pp389-428.

- Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R. y Haisman, D. 1992 Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5 Gluconolactone. En 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, Francia. p.p. 1095-1098.
- Nucles, R. O., Smith, D. M. y Merkel, R. A. 1991. Properties of heat-induced gels from beef skeletal, heart, lung and spleen protein fraction. J. Food Sci. 56:1165-1170.
- Ochiai, Y. y Chow, C., 2000, Myosin ATPase, En Seafood Enzymes utilization and influence on Postharvest Seafood quality Editor Norman F. Haard y Benjamin K. Simpson. Edit Marcel Dekker, Nueva York. E.U. pp. 69-70.
- Okamoto, Y., Fuchino, O., Horiuchi, S., Tamaya, T., Matsumoto, J. J., y Tsuchiya, T. 1993. Purification and characterization of two metalloproteinases from squid mantle muscle, myosinase I and myosinase II. Biochem. Biophys. Acta. 1161:97-104.
- Oliveira, C. 1998. Guía didáctica. Deterioro del pescado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Instituto de investigaciones pesqueras. Montevideo, Uruguay
- Otwell, W., S. y Hamann, D. D. 1979. Textural characterization of squid (*Loligo pealei* LESUER): Scanning electron microscopy of cooked mantle. J. Food Sci. 44, 1692-1636/1634.
- Ouali, A. Y Valin, C. 1980. Effect of muscle lysosomal enzymes and calcium activated neutral proteinase myofibrillar ATPase activity relationship with ageing changes. Meat Sci. 5-233
- Owen, J. E., Nuñez, F. A., Arias, M. T. y Cano de los Ríos O. 1982. Manual de prácticas de cursos de tecnología de la carne. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Zootecnia. Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Park J. W. 1994. Cryoprotection of muscle proteins by carbohydrates and polyalcohols. A review. J Aqua Food Product Tech 3:23-41.
- Pedersen, J. W. 1994. Química de los tejidos animales, Parte V, Agua. En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. 2ª edición. Zaragoza, España. Editor James F. Price. Edit. Acribia pp 125-171.
- Paredi, M. E. y Crupkin, M. 1997. Biochemical properties of actomyosin from frozen stored mantles of squid (*Illex argentinus*) at different maturation stages. J. Agric. Food Chem. 45:1629-1632.

- Pérez, Ch. M. L. y Alarcón, R. A. D. 1996. Enzimas que participan en el ablandamiento de la carne. Papel de las proteasas en el músculo. *Industria cárnica Latinoamericana*. 103, 35-40.
- Pérez Ch. M. L. y Guerrero, L. I. 1999. Las calpainas y su efecto sobre la estructura miofibrilar. Una revisión. *Industria cárnica Latinoamericana*. 115, 47-53.
- Pérez, Ch., M. L., Guerrero, L. I. y Ponce A. E. 2000. Estructura del músculo y conversión en carne. En: *Nuevas tendencias en la tecnología e higiene de la industria cárnica*. Editado por: Rosmini, M.R., Pérez-Alvarez, J.A. y Fernández-López J. pp 11-21.
- Pilosof, A. M. 2000a. Gelificación. En: *Caracterización Funcional y estructural de proteínas*. Pilosof, A.M.R y Bartholomai, G.B. editors. Edit. Ceudeba. CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) pp.75-95.
- Pilosof, A. M. 2000b. Solubilidad. En: *Caracterización Funcional y estructural de proteínas*. Pilosof, A.M.R y Bartholomai, G.B. editors. Edit. Ceudeba. CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) pp.60-75.
- Preuss, T., Lebaric, Z., Gilly, W. 1997. Post-Hatching development of circular mantle muscles in squid *Loligo opalescens*. *Biol. Bull.* 192: 375-387
- Price, J. F. y Schweigert B. S. 1994. En *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. 2ª edición. Editado por James F. Price. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Quirasco, B. M. y López-Munguía, C. A. 2006. Enzimas. En *Química de los alimentos*. 4ª edición. Editado por S. Badui Dergal. Editorial Pearson. México.
- Ramírez, J. A., Marín-Polo, M. O. and Bandam, E. 2000. Fish myosin aggregation as affect by freezing and initial physical state. *J. Food Sci.* 65: 556-561.
- Robson, R. M., Huff-Lonergan, E., Parrish, F. C. Jr., Ho, C. Y., Stromer, M. H., Huiatt, T. W., Bellin, R. M. y Seinet, S. W. 1997. *Postmortem* changes in the myofibrillar and other cytoskeletal proteins in muscle. *Proc. Recip. Meat Conf.* 50:43-52.
- Roncalés, P., Geesink, G. H., Van Laack, R. L. J. M., Jaime, I., Beltrán, J. A., Barnier, V. M. H. y Smulders, F. J. M. 1995. Meat tenderization: enzymatic mechanism. En: *Expression of tissue proteinases of protein degradation as related to meat quality*. Editores Ouali, A., Demeyer, D. I. y Smulders, F. J. M.

- Sakai, J., Sakaguchi, Y. y Matsumoto, J.J. 1981 Acid proteinase activity of squid mantle muscle: some properties and subcellular distribution. *Comp. Biochem. Physiol.* 40:791-794.
- Sakamoto, H., Kumazawa, Y., Toiguchi, S., Seguro, K., Soeda, T. y Motoki, M. 1995. Gel strength enhancement by addition of microbial transglutaminase during onshore surimi manufacture. *J Food Sci.* 60:300-304.
- Samejima K, Ishioroshi M, y Yasui T. 1981. Relative roles of the head and tail portions of the molecule in heat-induced gelation of myosin. *J Food Sci* 46:1412-1418.
- Samejima, K., Egelandsdal, B. y Fretheim, K. 1985. Heat gelation properties and protein extractability of beef myofibrils. *J. Food Sci.* 50:1540-1543, 1555.
- Sato, K., Ando, M., Kubota, S., Origasa, K., Kawase, H., Toyohara, H., Sakaguchi, M., Nakagawa, T., Makinodan, Y., Ohsuki, K., y Kawabata, M. 1997. Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *J. Agric. Food Chem.* 45: 343-348.
- SIAP Anuario pesquero 2004, (http://www.siap.gob.mx/ar_compec_principal.html).
- Sano, T., Noguchi, S.F., Matsumoto, J. J. y Tsuchiya, T. 1989. Role of F-actin in thermal gelation of fish actomyosin. *J. Food Sci.*, 54:800-804.
- Sano, T., Noguchi, S.F., Matsumoto, J. J. y Tsuchiya, T. 1990a. Thermal gelation characteristics of myosin subfragments. *J. Food Sci.*, 55:55-58, 70.
- Sano, T. Noguchi, S. F., Matsumoto, J. J. y Tsuchiya, T. 1990b. Effect of ionic strength on dynamic viscoelastic behavior of myosin during thermal gelation. *J. Food Sci.*, 55:54-58, 70.
- SEMARNAP, 2003. Anuario estadístico de pesca. Subsecretaría de pesca, México.
- Shenouda, S. Y. K. 1989. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Advances in food research.* 26:205-307.
- Sikorski, Z. E. 1994. The myofibrillar proteins in seafoods. En: *seafood proteins.* pp 40-57.
- Sikorski, Z. E., Kolakowska, A. y Burt, J. R. 1994. Cambios bioquímicos y microbianos subsiguientes a la captura. En *Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación.* p 80.

- Sikorski, Z. E. y Kolakowska, A. 1994a. Congelación de alimentos marinos. En: Tecnología de los productos del mar: Recursos, composición nutritiva y conservación. pp 153-154.
- Sikorski, Z. E. y Kolakowska, A. 1994b. Changes in proteins in frozen stored fish. En: seafood proteins. pp 99-112.
- Smith, D. M. 1994. Protein interaction in Gels: Protein-Protein Interactions. En Hettiachchy, N.S. y Ziegiet, G.R. Ed. Protein functionality in Food Systems. Marcel Dekker Inc, Nueva York, EUA, p 209-224. ISBN 0-8247-9197-5.
- Smyth, A. B., Smith, D., Vega-Warner, V. y O'Neill, E. 1996. Thermal denaturation and aggregation of chicken breast muscle myosin and subfragments. J. Agric. Food Chem., 44: 1005-1010.
- Smyth, A. B., Smith, D. M. y O'Neill, E. 1998. Disulfide bonds influence the heatinduced gel properties of chicken breast muscle myosin. J. Food Sci., 63:584-588.
- Stanley, D. W., Aguilera, J. M., Baker, K. W. y Jackman, R. L. 1998. Structure/proerty relationships of foods as affected by processing and storage. En: Phase/state transition in foods. Rao, M.A. y Hartel.R.W. editors. Marcel Dekker Inc., New York. Pp 1-50.
- Stanley, D. W., Stone, A. P. y Tung, M. A. 1996. Mechanical properties of food. En: Handbook of food analysis. Vol. 1, Nollet, L. editor. Marcel Deller, Inc., New York. pp 93-137.
- Steen, D., Claeys, E., Uytterhaegen, L. De Smet, S. y Demeyer, D. 1997. Early *post-mortem* conditions and the calpain/calpastatin system in relation to tenderness of double-muscle beef. .Meat Sci. 45:307-319.
- Stround, G. D., Early, J. C. and Smith, G. L. 1982. Chemical and sensory changes in iced *Nephrops norvegicus* as indicis of spoilage. J. Food Technol. 17, 541.
- Tazawa, T., Kato, S., Katoh, T. y Konno, K. 2002. Role of neck region in the thermal aggregation of myosin, J. Agric. Food Chem., 50: 196-202.
- Ueng, Y. E., y Chow, Ch. J. 1998. Textural and histological changes of different squid mantle muscle during frozen storage. J. Agric. Food Chem 46, 4728-4733.
- Valiela, D. y Wainwright, S. 1972. Locomotory aspects of squid mantle structure. J. Zool; Lond. 167: 437-449.

- Van Vliet, T. 1999. Rheological Classification of foods and instrumental techniques for their study. En Rosenthal, A.J. Ed. Food Texture. Aspen Publications, Maryland, EUA, p 65-98. ISBN 0-8342-1238-2.
- Vargas, S. S. 1980. Inspección sanitaria del calamar (*Loligo spp*) con base sus cambios organolépticos post-cocción. Tesis licenciatura. Médico Veterinario Zootecnista. UNAM.
- Vega-Warner, V. y Smith, D. M. 2001. Denaturation and aggregation of myosin from two bovine muscle types. J. Agric Food Chem., 49:906-912.
- Visessanguan, W. y An, H. 2000. Effects of proteolysis and mechanism of gel weakening in heat-induced gelation of fish myosin, J. Agric. Food Chem., 48: 1024-1032.
- Wako, Y., Ishikawa, S. y Muramoto, K. 1996. Angiotensin, I-converting enzyme inhibitors in autolysates of squid liver and mantle muscle. Biosci. Biotech. Biochem. 60:1353-1355.
- Weston, P. D., Barrett, A. J. y Dingle, J. T. 1969. Specific inhibition of cartilage breakdown. Nature. 222:285-286.
- Whipple, G. y Koohmaraie, M. 1991. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. J. Anim. Sci. 69:4449-4460.
- Xiong, Y. L. 1992. Thermally induced interactions and gelation of combined myofibrillar protein from white and red broiler muscles. J. Food Sci., 57:581-585.
- Xiong, Y. L. 1994. Myofibrillar protein from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functional properties in meat processing. Crit. Rev. Food Sci. and Nut., 34:293-320.
- Xiong, Y. L. Y Blanchard, S.P. 1994. Myofibrillar protein gelation: Viscoelastic changes related to heating procedures. J. Food Sci., 59:734-738.
- Yamaguchi, T., Yamashita, Y., Takeda, I. y Kiso. H. 1982. Proteolytic enzymes in green asparagus, kiwi fruit and mutocurrence and partial characterization. Agric. Biol. Chem. 46:1983-1986.
- Yoshioka T., Kinoshita Y., Kato S. Cho YJ. y Konno K. 2005. Preparation of heavy meromyosin from the autolyzed squid mantle muscle homogenate. Fish Sci. 71:123-129.

Zeece, M. G., Katoh, K., Robson, R. M. y Parrish, F. C. Jr. 1986. Effect of cathepsin D on bovine myofibrils under different conditions of pH and temperature. *J. Food Sci.* 3:769-780.

Zeece, M. G. y Katoh, K. 1989. Cathepsine D and its effects on myofibrillar proteins: a review. *J. Food Biochem.* 13:157-178.

Ziegler, G. R., y Acton, J. C. 1984. Mechanisms of gel formation by protein of muscle tissue. *Food Technol.* 38:77-82.

ANEXOS

10. Anexos

Anexo I

PREPARACION DE HEMOGLOBINA Y CASEINA

Se prepara hemoglobina al 1% en buffer universal 25 mM, se agita en baño maría a 60 °C durante 20 min. Posteriormente se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente y se ajusta a los pH de trabajo.

Se prepara caseína al 1% en buffer de fosfatos 20 mM, pH de 7 y 0.9% de NaCl, se agita en baño María a ebullición durante 20 min. Posteriormente se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente y se ajusta a los pH de estudio.

Anexo II

PREPARACION DE REACTIVOS PARA LA MEDICION DE FORMALDEHIDO (FA).

1. Disolución saturada de ácido bórico en glicerina.

Pesar 14 g de ácido bórico y disolver en 50 g de glicerina.

2. Disolución saturada de carbonato de calcio.

Medir 25 mL de agua destilada y agregar el carbonato de potasio agitando hasta que no se disuelva, no calentar.

3. Disolución madre de formaldehído.

Disolver 10 mL de formalina en 40% de metanol, aforar a 100 mL con agua desionizada.

4. Disolución madre de ácido pícrico

Disolver 2 g de ácido pícrico seco 100mL de tolueno seco.

5. Disolución de ácido pícrico

1 mL de disolución de stock de ácido pícrico, diluída a 100 mL con tolueno seco, secar con sulfato de sodio anhidro.

6. Disolución madre de TMA

Disolver 0.682g de TMA en 1 mL de HCl concentrado, diluir a 100 mL con agua destilada.

7. Disolución de TMA

1mL de disolución stock de TMA-HCl , “aforar” a 100 mL con agua desionizada.

Anexo III Análisis de varianza.**Tabla 3.** Análisis de varianza para la actividad en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	19018.790	5	3803.758	279.441	.0001
Error	939.230	69	13.612		
Total	19958.020	74			

Tabla 4. Análisis de varianza para la actividad enzimática en función del tiempo de almacenamiento a -20°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	15391.810	4	3847.953	31.423	.0001
Error	12245.845	100	122.458		
Total	27637.655	104			

Tabla 5. Análisis de varianza para la actividad enzimática en función del tiempo de almacenamiento a -80°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	11436.693	4	2859.173	18.015	.0001
Error	15871.426	100	158.714		
Total	27308.119	104			

Tabla 6. Análisis de varianza para el pH en función del tiempo de almacenamiento a 4°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	3.384	4	.846	1243.956	.000
Error	6.800E-03	10	6.800E-04		
Total	3.390	14			

Tabla 7. Análisis de varianza para el pH en función del tiempo de almacenamiento a -20°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	1.357	6	.226	404.644	.000
Error	1.173E-02	21	5.587E-04		
Total	1.368	27			

Tabla 8. Análisis de varianza para el pH en función del tiempo de almacenamiento a -80°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	1.002	6	.167	173.614	.000
Error	1.347E-02	14	9.619E-04		
Total	1.015	20			

Tabla 9. Análisis de varianza para la CRA en función del tiempo de almacenamiento a 4°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	5918.400	4	1479.600	3699.000	.000
Error	4.000	10	.400		
Total	5922.400	14			

Tabla 10. Análisis de varianza para la CRA en función del tiempo de almacenamiento a -20°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	6688.286	6	1114.714	7803.000	.000
Error	2.000	14	.143		
Total	6690.286	20			

Tabla 11. Análisis de varianza para la CRA en función del tiempo de almacenamiento a -80°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Actividad enzimática	6688.286	6	1114.714	7803.000	.000
Error	2.000	14	.143		
Total	6690.286	20			

Tabla 12. Análisis de varianza para de la solubilidad de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a 4°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Solubilidad	1014.756	4	253.689	574.112	.000
Error	4.419	10	.442		
Total	1019.175	14			

Tabla 13. Análisis de varianza para de la solubilidad de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -20°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Solubilidad	982.818	6	163.803	15211.167	.000
Error	.162	15	1.077E-02		
Total	982.980	21			

Tabla 14. Análisis de varianza para de la solubilidad de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -80°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Solubilidad	1146.573	6	191.096	1690.122	.000
Error	1.583	14	.113		
Total	1148.156	20			

Tabla 15. Análisis de varianza para grupos sulfhidrilos de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a 4°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Grupos sulfhidrilos	6010.655	4	1502.664	3683.563	.000
Error	4.079	10	.408		
Total	6014.734	14			

Tabla 16. Análisis de varianza para grupos sulfhidrilos de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -20°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Grupos sulfhidrilos	6501.812	6	1083.635	3409.615	.000
Error	4.449	14	.318		
Total	6506.261	20			

Tabla 17. Análisis de varianza para grupos sulfhidrilos de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -80°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Grupos sulfhidrilos	4684.090	6	780.682	1197.491	.000
Error	9.127	14	.652		
Total	4693.217	20			

Tabla 18. Análisis de varianza para Formaldehído de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a 4°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Formaldehído	888.248	4	222.062	3692.325	.000
Error	.902	15	6.014E-02		
Total	889.151	19			

Tabla 19. Análisis de varianza para Formaldehído de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -20°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Formaldehído	21.049	6	3.508	303.104	.000
Error	.324	28	1.157E-02		
Total	21.373	34			

Tabla 20. Análisis de varianza para Formaldehído de las proteínas del manto del calamar gigante en función del almacenamiento a -80°C .

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Formaldehído	26.380	6	4.397	149.337	.000
Error	.412	14	2.944E-02		
Total	26.793	20			

Tabla 21. Análisis de varianza para el efecto del pH sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
pH	3.770	3	1.257	1052.887	.000
Error	3.342E-02	28	1.194E-03		
Total	3.804	31			

Tabla 22. Análisis de varianza para el efecto del porcentaje de penetración sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
% Penetración	4.433	3	1.478	1381.972	.000
Error	2.994E-02	28	1.069E-03		
Total	4.463	31			

Tabla 23. Análisis de varianza para el efecto de la velocidad sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Velocidad	.588	3	.196	88.129	.000
Error	6.229E-02	28	2.224E-03		
Total	.650	31			

Tabla 24. Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante almacenado a 4°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Almacenamiento	13.340	4	3.335	1298.830	.000
Error	8.987E-02	35	2.568E-03		
Total	13.430	39			

Tabla 25. Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante almacenado a -20°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Almacenamiento	17.353	6	2.892	1897.748	.000
Error	7.468E-02	49	1.524E-03		
Total	17.428	55			

Tabla 26. Análisis de varianza para el efecto del almacenamiento sobre la fuerza gel de las proteínas del manto del calamar gigante almacenado a -80°C.

	Suma de cuadrados	G.L	Media de cuadrados	F	Sig.
Almacenamiento	2.308	6	.385	74.785	.000
Error	.180	35	5.143E-03		
Total	2.488	41			

Tabla 27. Correlación del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a 4°C

		DIAS	PH	CRA	FA	GEL	SOLUBILI	SH	AC PROT 2.7	AC PROT 3.1	AC PROT 6.1	AC PROT 7.3	AC PROT 7.6
DIAS	Pearson Correlation	1.000	.768	.818	.900	-.925	.809	-.916	-.697	-.924	-.569	-.899	-.686
	Sig. (2-tailed)	.	.001	.000	.000	.000	.000	.000	.004	.000	.027	.000	.005
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
PH	Pearson Correlation		1.000	.991	.611	-.926	.959	-.845	-.601	-.803	-.526	-.748	-.617
	Sig. (2-tailed)		.	.000	.016	.000	.000	.000	.018	.000	.044	.001	.014
	N		15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
CRA	Pearson Correlation			1.000	.635	-.933	.945	-.896	-.687	-.863	-.576	-.770	-.635
	Sig. (2-tailed)			.	.011	.000	.000	.000	.005	.000	.025	.001	.011
	N			15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
FA	Pearson Correlation				1.000	-.850	.762	-.788	-.494	-.725	-.579	-.930	-.728
	Sig. (2-tailed)				.	.000	.001	.000	.061	.002	.024	.000	.002
	N				15	15	15	15	15	15	15	15	15
GEL	Pearson Correlation					1.000	-.961	.896	.595	.868	.546	.909	.727
	Sig. (2-tailed)					.	.000	.000	.019	.000	.035	.000	.002
	N					15	15	15	15	15	15	15	15
SOLUBILI	Pearson Correlation						1.000	-.855	-.570	-.777	-.593	-.857	-.725
	Sig. (2-tailed)						.	.000	.027	.001	.020	.000	.002
	N						15	15	15	15	15	15	15
SH	Pearson Correlation							1.000	.869	.950	.803	.881	.774
	Sig. (2-tailed)							.	.000	.000	.000	.000	.001
	N							15	15	15	15	15	15
AC PROT 2.7	Pearson Correlation								1.000	.839	.849	.643	.677
	Sig. (2-tailed)								.	.000	.000	.010	.006
	N								15	15	15	15	15
AC PROT 3.1	Pearson Correlation									1.000	.652	.825	.716
	Sig. (2-tailed)									.	.008	.000	.003
	N									15	15	15	15
AC PROT 6.1	Pearson Correlation										1.000	.705	.778
	Sig. (2-tailed)										.	.003	.001
	N										15	15	15
AC PROT 7.3	Pearson Correlation											1.000	.868
	Sig. (2-tailed)											.	.000
	N											15	15
AC PROT 7.6	Pearson Correlation												1.000
	Sig. (2-tailed)												.
	N												15

Tabla 28. Correlación del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -20°C

		TIEMPO	PH	CRA	FA	GEL	SOLUBILI	SH	AC PROT 2.7	AC PROT 3.1	AC PROT 6.1	AC PROT 7.3	AC PROT 7.6
TIEMPO	Pearson Correlation	1.000	-.965	.612	.305	-.904	-.636	-.786	-.978	-.988	-.998	-.975	-.992
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.003	.179	.000	.002	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	N	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
PH	Pearson Correlation		1.000	-.495	-.127	.800	.652	.702	.953	.988	.970	.920	.936
	Sig. (2-tailed)		.	.023	.585	.000	.001	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	N		21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
CRA	Pearson Correlation			1.000	.435	-.660	-.251	-.655	-.480	-.536	-.591	-.570	-.666
	Sig. (2-tailed)			.	.049	.001	.273	.001	.028	.012	.005	.007	.001
	N			21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
FA	Pearson Correlation				1.000	-.492	-.532	-.178	-.295	-.212	-.271	-.463	-.296
	Sig. (2-tailed)				.	.023	.013	.440	.194	.357	.235	.034	.192
	N				21	21	21	21	21	21	21	21	21
GEL	Pearson Correlation					1.000	.533	.910	.914	.873	.907	.924	.920
	Sig. (2-tailed)					.	.013	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	N					21	21	21	21	21	21	21	21
SOLUBILI	Pearson Correlation						1.000	.220	.634	.631	.612	.682	.546
	Sig. (2-tailed)						.	.339	.002	.002	.003	.001	.010
	N						21	21	21	21	21	21	21
SH	Pearson Correlation							1.000	.790	.771	.804	.744	.836
	Sig. (2-tailed)							.	.000	.000	.000	.000	.000
	N							21	21	21	21	21	21
AC PROT 2.7	Pearson Correlation								1.000	.984	.985	.978	.961
	Sig. (2-tailed)								.	.000	.000	.000	.000
	N								21	21	21	21	21
AC PROT 3.1	Pearson Correlation									1.000	.993	.959	.970
	Sig. (2-tailed)									.	.000	.000	.000
	N									21	21	21	21
AC PROT 6.1	Pearson Correlation										1.000	.972	.991
	Sig. (2-tailed)										.	.000	.000
	N										21	21	21
AC PROT 7.3	Pearson Correlation											1.000	.959
	Sig. (2-tailed)											.	.000
	N											21	21
AC PROT 7.6	Pearson Correlation												1.000
	Sig. (2-tailed)												.
	N												21

Tabla 29. Correlación del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado a -80°C

		TIEMPO	PH	CRA	FA	GEL	SOLUBILI	SH	AC PROT 2.7	AC PROT 3.1	AC PROT 6.1	AC PROT 7.3	AC PROT 7.6
TIEMPO	Pearson Correlation	1.000	-.962	.612	.454	-.874	-.678	-.622	-.985	-.959	-.967	-.914	-.962
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.003	.039	.000	.001	.003	.000	.000	.000	.000	.000
	N	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
PH	Pearson Correlation		1.000	-.576	-.314	.813	.737	.480	.957	.893	.956	.901	.968
	Sig. (2-tailed)		.	.006	.166	.000	.000	.028	.000	.000	.000	.000	.000
	N		21	21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
CRA	Pearson Correlation			1.000	.342	-.897	-.182	-.653	-.670	-.706	-.716	-.787	-.493
	Sig. (2-tailed)			.	.129	.000	.429	.001	.001	.000	.000	.000	.023
	N			21	21	21	21	21	21	21	21	21	21
FA	Pearson Correlation				1.000	-.521	-.313	-.229	-.351	-.549	-.301	-.227	-.443
	Sig. (2-tailed)				.	.016	.167	.318	.118	.010	.185	.322	.044
	N				21	21	21	21	21	21	21	21	21
GEL	Pearson Correlation					1.000	.456	.714	.888	.924	.901	.907	.779
	Sig. (2-tailed)					.	.038	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	N					21	21	21	21	21	21	21	21
SOLUBILI	Pearson Correlation						1.000	.201	.612	.628	.573	.478	.771
	Sig. (2-tailed)						.	.382	.003	.002	.007	.028	.000
	N						21	21	21	21	21	21	21
SH	Pearson Correlation							1.000	.673	.749	.642	.718	.488
	Sig. (2-tailed)							.	.001	.000	.002	.000	.025
	N							21	21	21	21	21	21
AC PROT 2.7	Pearson Correlation								1.000	.952	.991	.964	.933
	Sig. (2-tailed)								.	.000	.000	.000	.000
	N								21	21	21	21	21
AC PROT 3.1	Pearson Correlation									1.000	.927	.906	.916
	Sig. (2-tailed)									.	.000	.000	.000
	N									21	21	21	21
AC PROT 6.1	Pearson Correlation										1.000	.979	.910
	Sig. (2-tailed)										.	.000	.000
	N										21	21	21
AC PROT 7.3	Pearson Correlation											1.000	.843
	Sig. (2-tailed)											.	.000
	N											21	21
AC PROT 7.6	Pearson Correlation												1.000
	Sig. (2-tailed)												.
	N												21

Productos generados

11. PRODUCTOS GENERADOS:

Trabajos presentados en eventos especializados:

1. " Effect of frozen storage on the gelling properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle". New Orleans, Louisiana. Estados Unidos. Julio 2005. INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY
2. " Efecto de la maduración en la fuerza de geles de proteína muscular de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) ". Puerto Vallarta, Jalisco, del 4-7de mayo del 2004. ACADEMIA MEXICANA DE INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA EN INGENIERÍA QUÍMICA
3. " Effect on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*) during storage".Las Vegas, Estados Unidos, Julio 2004. INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY
- 4." Viscoelastic and gel strength parameters of heat-induced giant squid protein gels ". Chicago, Illinois 16/06/2003. INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY
5. "Changes in protein solubility during frozen storage of giant squid "*Dosidicus gigas*". Anaheim, California Estados Unidos 16/06/2002. INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY

Artículo:

Octavio Dublán-García, Ramón Cruz-Camarillo, Isabel Guerrero-Legarreta and Edith Ponce-Alquicira.

Effect Of Refrigerated Storage On Proteolytic Activity, Physicochemical And microstructural Properties Of Giant Squid (*Dosidicus Gigas*) Mantle Muscle. Journal of Muscle Foods

1 **EFFECT OF REFRIGERATED STORAGE ON PROTEOLYTIC ACTIVITY,**
2 **PHYSICOCHEMICAL AND MICROSTRUCTURAL PROPERTIES OF GIANT SQUID**
3 **(*Dosidicus gigas*) MANTLE MUSCLE**
4
5
6
7

8 Octavio Dublán-García¹, Ramón Cruz-Camarillo², Isabel Guerrero-Legarreta¹ and Edith
9 Ponce-Alquicira^{1*}

10
11
12
13
14 ¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana.
15 Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 Mexico, D.F. MEXICO.

16
17 ² Departamento de Microbiología, ENCB, Instituto Politécnico Nacional, Carpio y Plan de
18 Ayala s/n C.P. 11340 Mexico, D.F.

19
20
21 *Running title:* Squid Muscle Proteolysis and Microstructure
22
23
24

25 *Corresponding Author:

26 Dr Edith Ponce-Alquicira

27 Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa. Av.
28 San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C.P. 09340 Mexico, D.F., Mexico. Tel.: (52)(55)
29 5804 47 17 Fax: (52)(55) 5804 47 12

30 e-mail: pae@xanum.uam.mx
31
32
33
34

35 **Abstract**

36

37 Giant squid (*Dosidicus gigas*) is caught along the Pacific Coast of Mexico; it possesses
38 a high proteolytic activity which renders a low quality food material. Squid mantle
39 endogenous proteases were partially characterized; physicochemical and structural
40 changes during storage at 4°C were also examined. High proteolytic activity was observed
41 at acidic and alkaline pH values. Proteases were strongly inhibited by leupeptine and
42 pepstatin A, as well as by phenyl methyl sulfonyl fluoride, indicating the possible presence
43 of serine, cysteine and metal-proteases. Myosin heavy chain was degraded during storage
44 as shown on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis patterns
45 resulting in a significant decrease ($p < 0.001$) in muscle water holding capacity, texture and
46 gelling capacity. Muscle deterioration was evident in scanning electron micrographs,
47 where the initial compact structure loosened during storage.

48

49

50 Keywords: Giant Squid, Proteolysis, Myofibrillar Proteins, Texture

51

52

53

54

55

56 INTRODUCTION

57
58 The giant squid (*Dosidicus gigas*) is a seafood resource found in abundance on the
59 Pacific Coast of Mexico, mainly in the Gulf of California. Harvest varies considerably due
60 to environmental factors such as “El Niño” (Morales Bojórquez 2002). Eighty percent of
61 total catch is exported as raw material to the food industry in Korea, United States and
62 Canada as reported by the Mexican Aquiculture and Fishing Committee (CONAPESCA
63 2003); the rest is merchandised frozen or under refrigeration on ice as a non-expensive
64 protein source (SAGARPA 2004). However, giant squid mantle muscle is poorly accepted
65 mainly because of its shorter shelf life, as compared to other marine species, thus
66 reducing the possibilities for its commercialization. It is known that endogenous enzymes
67 are involved in the gradual loss of muscle freshness before bacterial growth takes place
68 leading to spoilage (Carballo and López 1991; Pacheco et al. 2000).

69 Degradation rate varies among squid species due to several factors such as size,
70 physiological stage, feeding habits, catching methods and storage temperature.
71 Biochemical changes promote various deterioration stages and consequently different
72 degrees of freshness when animals are caught (Sikorski et al. 1976). Cathepsins B, D, and
73 E have been identified in several tissues from squid (Inaba et al. 1976; Leblanc and Gill,
74 1982). Hameed and Haard (1985) reported that extracts from the mantle muscle and
75 hepatopancreas of Atlantic short finned squid (*Illex illecebrosus*) contain a chlorine
76 activated enzyme which catalyzes a transpeptidation reaction characteristic of cathepsin
77 C. Several researchers have referred the presence of high levels of endogenous
78 proteolytic enzymes in other squid species (Sakai and Matsumoto, 1981; Tsuchiya et al.
79 1978; Morishita, 1974). Sakai and Matsumoto (1981) reported the existence of acid
80 proteases; while, Rodger et al. (1984) and Kolodziejaska et al. (1987) demonstrated that
81 proteases in squid muscle caused myosin degradation and suggested that the proteolysis
82 might influence the textural quality of cooked squid meat. Cathepsins are generally
83 associated with myofibrillar degradation, whereas alkaline proteases appear to be
84 responsible for textural changes cooked fish (Lin et al. 1980; McLay, 1980; Chen et al.
85 1978; Iwata et al. 1974).

86 Enzymatic deterioration of giant squid mantle muscle renders low quality food and
87 restrains further processing affecting texture and functional properties (Jiang and Lee
88 1985; Ebina et al. 1995; Paredi et al. 1999; Ayensa et al. 2002). As few reports were found
89 in the literature regarding quality lost of giant squid mantle during refrigeration; therefore,

90 the objective of this study was to evaluate the physicochemical and microstructural
91 changes in giant squid mantle muscle stored at 4 C associated to endogenous proteolysis.

92

93 **MATERIALS AND METHODS**

94

95 **Reagents**

96 Coomassie Brilliant Blue R-250, disodium ethylene diamine acetic acid (EDTA),
97 N,N,N-tetra-methyl ethylene diamine (TEMED), 2- β -mercaptoethanol, phenyl sulfonyl
98 fluoride (PMSF), iodoacetic acid (IA), pepstatin A, pyrophosphate, leupeptin, trypsin
99 inhibitor, chemostatin and hemoglobin were purchased from Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis
100 MO, USA). Acrylamides, Tris-HCl, ammonium persulfate, sodium dodecyl sulfate (SDS),
101 glycerin and molecular weight standards were from Bio-Rad Laboratories Ltd (Ontario,
102 Canada). Casein quality Hammarsten was from Research Organics Inc. (Cleveland, OH,
103 USA). Sodium chloride, phosphoric acid, boric acid, acetic acid, trichloroacetic acid (TCA),
104 methanol and sodium and potassium buffer were from J.T. Baker (Mexico, Mexico).

105

106 **Samples**

107 Giant squid (*Dosidicus gigas*) was purchased at the Central Fish and Seafood
108 Market, "La Viga", in Mexico City. Animals were caught around 18-20 hours before
109 sampling, and transported to Mexico City on ice under commercial conditions. Samples
110 were taken from three animals of approximately 5.5 kg, vacuum-packed in individual
111 plastic bags and immediately stored at 4C for analysis.

112

113 **Acid and Alkaline Protease Extraction**

114 Extraction of proteases was carried out according to the method reported by
115 Okamoto et al. (1993) as follows: 100 g of frozen samples were finely cut up and
116 homogenized (1:1 w/v) with phosphate buffer (25 mM, pH 7, 0.9% NaCl). The extract was
117 centrifuged at 11000 g for 20 min at 4C (centrifuge J2-MI, Beckman, Palo Alto, CA, USA).
118 The supernatant was collected, and subjected to fractionation with 20 to 60% ammonium
119 sulfate saturation; the precipitate was re-suspended in phosphate buffer (25 mM, pH 7,
120 0.9% NaCl), dialyzed overnight against the same buffer using a 12000 kDa cut off dialysis
121 tube (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), and stored at -20C until analysis.

122 **Partial characterization of squid mantle proteases**

123

124 **Proteolytic Activity**

125 Protease activity was determined by the following methods: the one described by
 126 Kunitz (1947), where 1% casein in phosphate buffer (25 mM, pH 7, NaCl 0.9%) was used
 127 as substrate for neutral and alkaline proteases. The second method, described by Anson
 128 (1938), where 1% hemoglobin in universal buffer (25 mM phosphoric acid: 25 mM acetic
 129 acid: 25 mM boric acid 1:1:1 v/v/v) was used as substrate for acidic proteases. Eppendorf
 130 tubes containing 1 mL substrate were incubated between 4 to 80C for 10 min in a water
 131 bath; 0.25 mL enzymatic extract was added and incubated for another 10 min in order to
 132 allow hydrolysis to take place. The reaction was stopped by addition of 0.20 mL of 50%
 133 TCA. Samples were cooled down to 4C and centrifuged for 15 min at 11,000 g (Eppendorf
 134 Micro Beckman centrifuge, model J2-MI, Palo Alto, CA) to remove the precipitated protein.
 135 Supernatant absorbance was read at 280 nm on a Beckman DU-650 spectrophotometer
 136 (Fullerton, CA, USA). One unit of activity was defined as the enzyme amount yielding a
 137 0.001 $A_{280\text{ nm}}$ change per minute under the conditions mentioned above (Yamaguchi et al.
 138 1982; Ebina et al.1995; Lo Piero et al. 2002). All determinations were carried out in
 139 triplicate.

140

141 **pH and Temperature Profile of Squid Proteases**

142 Enzymatic activity was studied within 4 to 80C temperature range. As the maximum
 143 enzymatic activity was at 35C, pH optimum activity was studied at a pH range from 1.0 to
 144 8.0 in intervals of 0.2 units at 35C. All determinations were carried out in triplicate

145

146 **Proteins Profile in the Enzymatic Extract**

147 Protein pattern in squid mantle muscle proteases was carried out by sodium
 148 dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as reported by García
 149 et al. (1993). Protein in the extract was analyzed by the Biuret method described by
 150 Gornall et al. (1949). The extract was diluted (1:4) in 2% SDS + 5% 2-β-mercaptoethanol.
 151 Volumes of 15 μL and 10 μL for samples and molecular weight standard markers (6.5 to
 152 200 kDa), respectively were applied to 7.5% acrylamide separation gels and 4%
 153 acrylamide stacking gels. Electrophoresis was carried out at 4°C, and 200 volts for 50 min

154 in a Mini-Protean II slab cell (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). After staining with 1%
 155 Coomassie blue R-250 and developing with methanol:acetic acid:water (40:10:50 v/v/v),
 156 gels were scanned on a Gel-Doc 2000 image analyzer (Bio-Rad, Richmond, CA, USA),
 157 and molecular weights were calculated using a Quantity One™ software, version 4 (Bio-
 158 Rad, Richmond, CA, USA).

159

160 **Protease Inhibitor Effects**

161 The effect of several protease inhibitors on the enzymatic extract activity was
 162 tested: EDTA and pyrophosphate (as metal-protease inhibitor; Konno and Fukuzawa
 163 1993); pepstatin A (as aspartic protease inhibitor), leupeptin, PMSF, trypsin inhibitor and
 164 chemostatin (as serine protease inhibitor; Kolodziejaska and Sikorski, 1996; Ebina et al.
 165 1995; Murray 1990; Carballo and López 1991); iodoacetic acid (as cysteine protease
 166 inhibitor; Carballo and López 1991). Enzymatic extract aliquots were mixed 4:1 (v/v) with
 167 each one of the tested inhibitors and incubated at 35C for 10 min; the remaining proteolytic
 168 activity was analyzed as described before at the obtained optimum pH and temperature
 169 conditions and data was compared to control sampled with no added inhibitors to obtain
 170 the residual activity. Inhibitor concentrations were chosen based on previously reported
 171 proteinases classification studies (Ebina et al. 1995; Konno and Fukuzawa, 1993; Carballo
 172 and López 1991; Murray 1990; Hameed and Haard, 1985). All determinations were carried
 173 out in triplicate.

174

175 **Proteases Effect on Muscle Tissue**

176 The effect of proteases was studied for pH, water-holding capacity (WHC), texture
 177 and microstructure of raw squid mantle muscle during storage at 4C.

178

179 **pH**

180 Ten grams of muscle were homogenized with 90 mL of distilled water for 1 min in
 181 a domestic blender; connective tissue was removed with a cheese cloth as described by
 182 Owen et al. (1982). pH was measured on a digital Beckman pH-meter (Q50 Beckman,
 183 Fullerton, Analytical Business unit, CA, USA), previously calibrated with sodium and
 184 potassium buffers at pH 4.0 and 7.0, respectively. All determinations were carried out in
 185 triplicate.

186 **Water-Holding Capacity**

187 WHC was carried out according to the method reported by Hamm (1975) at days 0,
188 2, 4, 6, 8, 10 and 12 of storage at 4C. Five grams of finely ground sample were
189 homogenized with 8 mL 0.6 M NaCl. The homogenate was placed in an ice bath and
190 stirred with a glass rod for 1 min. Then tubes were left on ice for another 30 min, stirred
191 again for 1 min and centrifuged at 8,000 g for 15 min. Finally, the supernatant volume was
192 measured with a cylinder. WHC was reported by difference as milliliters of 0.6 M NaCl held
193 per 100 g of muscle. All determinations were carried out in triplicate.

194

195 **Microstructure**

196 Changes in the microscopic structure were observed at days 0, 5 and 9 of storage
197 at 4C on a scanning electron microscopy (SEM). Muscle samples (5x5x5 mm) were
198 immersed in 5% glutaraldehyde in phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) for 24 h at 4 C and
199 fixed with 2% osmium tetra oxide for 2 h. Fixed specimens were gradually dehydrated in
200 ethanol and dried to the critical point drying method using carbon dioxide (CO₂ at 73 atm,
201 31C) in a Samdri-780 B drier (Tousimis Research Co., USA). Specimens were finally
202 coated with a 25 nm gold layer in a vacuum evaporator (Bal-Tec, SCD 050, Liechtenstein)
203 and observed with a scanning electron microscope (JEOL JSM-5900 LV, Tokyo, Japan).

204

205 **Texture**

206 Texture was reported as shear force measured at days 0, 2, 4, 6 and 8 of storage
207 in 1 cm³ squid mantle muscle samples both raw and cooked. Cooked squid samples were
208 heated in a water bath to 70C internal temperature. Samples were subjected to a shear
209 force perpendicular to muscle fibers, using a TA-XT2 texture analyzer (Texture
210 Technologies Corp, Scarsdale, NY, USA) fitted with a 49 N load cell, and a Warner-
211 Bratzler cell. Data was analyzed using the Texture Expert v1.20 software (Stable Micro
212 Systems, Surrey, UK). All determinations were carried out in at least 10 replicates.

213

214

215

216

217

218 **Proteases Effect on Myofibrillar Proteins**

219 **Myofibrillar Protein Extraction and Protein Profile**

220 Myofibrillar proteins were extracted according to a modification of the method
221 described by Ngapo et al. (1992). Twenty five grams of muscle were homogenized with ice
222 and cold water (1:2:1 w/w) in a domestic blender. The mixture was stored during 10 min in
223 a water bath at 4 C and sieved to remove all connective tissue; 2 to 3 cold water volumes
224 were added and stirred for another 15 min. Samples were centrifuged at 3500 g for 25 min
225 at 4C; the precipitate containing myofibrillar proteins was re-suspended in phosphate
226 buffer (50 mM, pH 7.0, 0.6 M NaCl) to obtain a 25 mg/mL final protein concentration. The
227 myofibrillar extracts were analyzed through the storage time by SDS-PAGE according to
228 the method previously described, using 10% acrylamide separating gels and 4%
229 acrylamide stacking gels containing 0.1% SDS, using 45 to 200 kDa molecular weight
230 standard markers.

231

232 **Protein Gelling Ability and Gel Strength**

233 Myofibrillar protein solution obtained as described above was placed in test tubes
234 (30 mm diameter, 35 mm high), and heated in a water bath. Temperature was gradually
235 increased at 1°C/min up to 70C. Then samples were placed on ice for 30 min and stored
236 at 4C during 12 h. Test tubes with gelled proteins were penetrated 70% of their height with
237 an 8 mm cylindrical probe at 1 mm/sec. Analysis was carried out on a TA-XT2 texture
238 analyzer (Texture Technologies) fitted with a 49 N load cell and a Texture Expert v1.20
239 software (Stable Micro Systems). All determinations were carried out at least in 10
240 replicates.

241

242 **Statistical Analysis**

243 Data were subjected to analysis of variance and Duncan multiple range tests, using
244 a SPSS 8.0 for Windows software (SPSS Inc. 1997).

245

246

247

248

249

RESULTS AND DISCUSSION

Proteolytic Activity

Figure 1 shows the endogenous proteolytic activity of giant squid mantle muscle in the pH range from 1.0 to 8.0. Five peaks of maximum activity were observed at pH values 2.7, 3.1, 6.1, 7.3 and 7.6 ($p < 0.001$). Activity at pH 6.1, 7.3 and 7.6 was higher than that at pH 2.7 and 3.1 ($p < 0.001$), probably because neutral and alkaline proteases were more active in the muscle substrate than acidic proteases. This data agreed with several studies from other squid species (Sakai and Matsumoto 1981; Konno and Fukazawa 1993, Gómez-Guillen et al. 1996, Wasson et al. 1992). As protease structure and activity varies within species, and maximum activity may occur at different pH. Rodger et al. (1984) described the maximum activity of proteases in *Loligo frobessi* at pH 7.5; Sakai and Matsumoto (1981) found an acidic protease (pH 3.1) in *Ommastrephes sloani pacificus*. The highest protease activity in *Illex illecebrosus* and *Loligo pelaleienseur* was reported at pH 2.6 and 3.6, respectively (Leblanc and Gill 1982), although other proteases were also observed in these species at pH 7.8 and 8.9 (Eillen and Gill 1982). Two metal proteases were reported in *Todarodes pacificus* (myosinase I and myosinase II) showing maximum activity at pH 7, 40 C (Okamoto et al. 1993), whereas a protease obtained from *Illex argentinus* liver extract had its highest activity at pH 2.6 to 4.0 (Kolodziejska et al. 1994), while Zeece and Katoh (1989) reported cathepsin D activity at pH 3.0 to 4.5. The proteolytic activity observed at pH close to neutrality (6.1, 7.3 and 7.6) could also be due to the presence of other enzymes such as sulfhydryl proteases, as these enzymes were reported in yellow sole (*Limanda aspera*, Wasson et al. 1992). Other authors also reported enzymatic activity at pH 7.0 in *Todarodes pacificus* mantle muscle (Konno and Fukasawa 1993), in carp (*Cyprinus carpio*) and pagro (*Pagrus major*) by Wasson et al. (1992).

Proteolytic activity had maximum at 35C, and decreased rapidly above 40C at pH 2.7, 3.1 and 7.6; conversely, at pH 6.1 and 7.3 this decrease was less marked (Figures 2 and 3). Similar results were reported by Sakai et al. (1981) and Kolodziejska et al. (1995) in squid mantle extract (*Ommastrephes sloani pacificus*) and Pacific codfish muscle (*Gadus morhua*) respectively. Peak activity at 55C at pH 7.3 could be due to cathepsin proteases, as reported by An et al. (1995) that detected the maximum activity of cathepsin L in surimi from *Pacific hake* at 55C.

Samples at pH 6.1 showed an activity decrease at 40C and subsequent increase at

283 45C, similar to the activity of squid liver extract from *Illex argentinus* (Kolodziejka et al.
284 1994) and that of *Todaropsis eblanae* (Ayensa et al. 1999). Enzymatic activity was also
285 observed even at 65C at pH 6.1, 7.3 and 7.6, in agreement with the results reported by
286 Ayensa et al. (1999). This could represent a disadvantage in giant squid processing, as
287 heat-activated proteases at 50 to 65C may reduce quality by promoting excessive
288 softening, due to a rapid myosin and other protein depletion during gelling processes
289 (Haard 1994). Considerable activity was observed at alkaline pH suggesting the presence
290 of both cathepsins and alkaline proteases, as reported by other authors (Leblank et al.
291 1982; Lin et al. 1980; McLay 1980; Chen et al. 1978; Reddi et al. 1972). The presence of
292 cathepsins was confirmed by SDS-PAGE showing bands from 11,600 to 264,000 Da (Data
293 not shown). Based on the peak enzymatic activity pH and molecular weight, these bands
294 appear to be cathepsins E and D (Leblank et al. 1982).

295

296 **Effect of Inhibitors on Proteases**

297 Proteolytic activity was inhibited by chemostatin, pepstatine and leupeptine (82, 87
298 and 68%, respectively) (Table 1); EDTA, pyrophosphate and trypsin inhibitor inhibited 50%
299 of proteolysis. Leupeptine and iodoacetic acid are reported as thiol proteinase inhibitors
300 (Benjakul et al. 1996). Kirschke and Barrett, (1987), suggested that several giant squid
301 enzymes belong to the thiol group, in agreement with Cárdenas-López and Haard (2005),
302 as well as Sakai et al. (1981) who reported the presence of acidic thiol proteases (pH 2.9)
303 in squid mantle muscle. Nagashima et al. (1992), observed inhibition of squid mantle
304 proteases by EDTA, PMSF and soybean trypsin inhibitor, concluding that metallo, serin
305 proteases were present in squid gels (*Loligo bleekeri*). In addition, Morrissey et al. (1993),
306 and An et al. (1994) demonstrated that myofibrillar protein degradation in fish was due to
307 thiol cathepsin activity.

308

309 **Variations in WHC, pH and structure**

310

311 Both pH and WHC parameters increased during storage of squid mantle muscle
312 (Figure 4). These changes may be associated to enzymatic cleavage of the peptide bonds
313 and release of more polar groups active for water binding, increasing repulsive forces
314 between proteins and thus protein solubility (Flores and Bermell, 1984; Zayas, 1997). In

315 addition, the pH increase may be the result of proteolysis and trimethylamine degradation
 316 (Huss, 1999). WHC influences the quality of meat and meat products, it is associated to
 317 juiciness, tenderness, taste and texture which are important to manufacture or improve
 318 muscle foods (Kuo et al. 1991; Zayas, 1997a). According to Hamm (1975), Price and
 319 Schweigert (1994) water holding in muscle tissue is closely related to the myofibril
 320 network. Functional properties of proteins in fresh meat are probably affected by
 321 proteolytic changes during storage (Zayas, 1997a; Tsuchiya et al. 1978).

322 The state of free or bound water is affected by myofibrillar protein arrangement; the
 323 three-dimensional network of filaments in myofibrils provides an open space for water to
 324 be immobilized (Zayas, 1997a). The compact structure observed in SEM at the beginning
 325 of the study (Figure 5) loosens during storage as a result of proteolysis, promoting a
 326 relaxed fiber structure, empty spaces between fibers and connective tissue fibrils forming
 327 amorphous areas. These changes were evident as the muscle turned soft with a reduction
 328 in shear force. Structural changes in fibers and degradation of connective tissue of
 329 refrigerated raw muscle have also been observed in beef (Nishimura et al. 1994) and in
 330 fish muscle (Ando et al. 1999; Bremner and Hallet 1985; Hallet and Bremner 1988). While
 331 disintegration of fish collagen fibrils is responsible for fish softening within one day of
 332 refrigerated storage (Sato et al. 1997).

333

334 **Muscle Texture**

335 Squid is eaten cooked as well as raw; in both cases texture is a determinant
 336 characteristic for consumer's acceptance (Ando et al. 1999). Although, squid is used as
 337 raw material for surimi-type products (Borderías et al. 1983). Texture expressed as shear
 338 force necessary for sample breakage, decreased significantly ($p < 0.001$) from 16.5 N to 7 N
 339 after 8 days of storage at 4C in raw mantle muscle (Figure 6), indicating that squid
 340 becomes softer as a result of proteolysis as reported by other authors (Ramírez et al.
 341 2004). Similar behavior was observed in cooked muscle although values were slightly
 342 higher, conversely to the results reported by Otwell and Hamman (1979) and Kugino and
 343 Kugino (1994) who found that cooked squid mantle muscle was softer than raw muscle.
 344 Strength reduction in cooked as well as raw squid meat was probably due to degradation
 345 of the myosin chains and changes in the muscle fiber network (Rodger et al. 1984;
 346 Nagashima et al. 1992).

347

348 **Myofibrillar Protein Degradation**

349 Protein degradation in muscle homogenates was evident on SDS-PAGE (Figure 7);
350 myosin heavy chains (MHC) (200kDa), paramyosin (110 kDa) and actin (45 kDa) bands
351 were observed in the fresh mantle muscle at the beginning of storage. MHC bands were
352 not observed after 6 days of storage. Changes in actin were less evident, although band
353 intensity was also reduced, whereas paramyosin and other bands remained unaltered
354 throughout the study. This data is similar to that reported by Konno et al 2003.
355 Degradation in MHC was also reported by Signorini et al. (2003) in fermented pork;
356 degradation of this protein may be associated to the very active endogenous enzymes or
357 to native proteolytic microflora, in both cases changes in myosin could be the major source
358 of texture alteration in giant squid mantle.

359

360 **Gel Strength**

361 Technological properties of giant squid were determined by evaluating its gel-
362 forming ability. This property has been used as an indicator of myofibrillar protein
363 functionality (Sikorski et al. 1976; Phillips et al. 1990). Protein gels are formed by
364 myofibrillar protein interlinking (Barbut 1994, Zayas 1997b). Myosin degradation occurred
365 during refrigerated storage negatively affected gel strength as observed in Figure 8
366 ($p < 0.001$). A rapid decrease in gel strength was observed during the first 6 days of
367 storage, thus indicating the rapid denaturation of the myofibrillar fraction, parallel to the
368 decrease in MHC band density shown in Figure 7. From day 6 to 9 the gel strength values
369 were constant but MHC was not detected in the SDS-PAGE patterns, although
370 paramyosin and actin bands were still present. Therefore MHC degradation could be the
371 main source of texture and gelling deterioration.

372

373 **Conclusions**

374 Proteolytic activity was observed in raw squid muscle mantle at acidic pH range
375 from 2.7 to 3.1, and at alkaline pH 6.1 to 7.6. Proteases were strongly inhibited by
376 leupeptine, pepstatin and PMSF, indicating the possible presence of serin, cystein and
377 metallo-proteases. Proteolysis induced structural changes of mantle muscle observed with
378 SEM, where a compact structure turned open with empty spaces between fibers and
379 connective tissue fibrils changed from an organized to an amorphous pattern, resulting in a
380 decrease in shear force. MHC was particularly affected during storage as shown on SDS-

381 PAGE. Results indicated that, although giant squid mantle muscle has good
 382 characteristics such as consistent texture and good gel formation ability, these
 383 characteristics deteriorate rapidly in refrigerated storage and care must be taken in order
 384 to reduce this type of deterioration.

385

386 **Acknowledgements**

387 Octavio Dublán-García thanks the National Council of Science and Technology
 388 (CONACYT, Mexico) for a graduate scholarship. Also thanks go to Dr Sepulveda for his
 389 technical assistance in SEM.

390

391 **References**

392 AN, H., PETERS, M.Y., SEYMOUR, T.A. and MORRISSEY, M.T. 1995. Isolation and
 393 activation of cathepsin I-inhibitor complex from pacific whiting (*Merluccius productus*).
 394 J. Agric. Food Chem. 43, 327-339.

395 ANDO, M., ANDO, M., TSUKAMASA, Y., MAKINODAN, Y., and MIYOSHI, M.1999.
 396 Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by
 397 freshness. J. Food Sci. 64, 659-662.

398 ANSON, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with
 399 haemoglobin. J. Gen. Physiol. 22, 79–89.

400 Ashie I. y Lanier T. 2000. Transglutaminasas in Seafood Processing, En Seafood
 401 Enzymes utilization and influence on Postharvest Seafood quality Editor
 402 Norman F. Haard y Benjamin K. Simpson. Edit Marcel Dekker, Nueva York.
 403 E.U.pp 147- 153.

404

405 AYENSA M.G., AN, H. GÓMEZ, G.M.C., MONTERO, P. and BORDERÍAS, A.J. 1999.
 406 Partial protease activity characterization of squid (*Todaropsis eblanae*) mantle. Food
 407 Sci. Tech. Int. 5, 391-396.

408 AYENSA, M.G., MONTERO, M.P., BORDERÍAS, A.J. and HURTADO, J.L. 2002.
 409 Influence of some protease inhibitors on gelation of squid mantle. J. Food Sci. 67,
 410 (5)1636-1641.

411 BARBUT, S. 1994. Protein gel ultraestructure and funtionality. In: *Protein Functionality in*
 412 *Food Systems* (N.S. Hettiarachchy and G.R. Ziegler eds.) pp. 383-433, Marcel
 413 Dekker, New York.

- 414 BENJAKUL, S., SEYMOUR, T. A. MORRISSEY, M.T. and AN H. 1996. Proteinase in
 415 pacific whiting surimi wash water: identification and characterization. J. Food Sci. 61,
 416 (6)1165-1170.
- 417 BORDERÍAS, A.J., LAMÚA, M. and TEJEDA, M. 1983. Texture analysis of fish fillets and
 418 minced fish by both sensory and instrumental methods. J. Food Technol. 18, 85-95.
- 419 BREMNER, A.H., and HALLET, C.L. 1985. Muscle fiber connective tissue junctions in the
 420 blue grenadier fish (*Mscrucons novaezelandae*). A scanning electron microscope
 421 study. J. Food Sci. 50, 975-980.
- 422 CARBALLO, B. and LÓPEZ D T. 1991. *Manual de Bioquímica y Tecnología de la Carne*.
 423 pp 1-60, Madrid Vicente, Spain.
- 424 CÁRDENAS-LÓPEZ J.L. and HAARD N.F. 2005. Cysteine proteinase activity in jumbo
 425 squid (*Dosidicus gigas*) hepatopancreas extracts . J Food Biochem 29 (2): 171-186.
- 426 CHEN C., YAN, T. and CHEN, H. 1978. Purification and properties of trypsin-like enzymes
 427 and a carboxypeptidase a from *Euphasia superba*. J. Food Biochem. 2, 349-366.
- 428 CONAPESCA. 2003. *Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería de*
 429 *Calamar gigante*. <http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca>. October 6, 2005
- 430 EBINA, H., NAGASHIMA, Y., ISHIZAKI, S. and TAGUCHI, T. 1995. Myosin heavy chain-
 431 degrading proteinase from spear squid muscle. Food Res. Internal. 28, 31-36.
- 432 FLORES, J. and BERMELL, S. 1984. Capacidad de gelificación de las proteínas
 433 miofibrilares. Rev. Agroquim. Tecnol. Alimt. 26(3):151-158.
- 434 GARCÍA, C.F.L., DIMES, L.E. and HAARD, N.F. 1993. Substrate-gel electrophoresis for
 435 composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase
 436 inhibitors. Analytic. Biochem. 214, 65-69.
- 437 GÓMEZ-GUILLÉN, M.C., SOLAS, M.T., BORDERÍAS, A.J. and MONTERO, P. 1996.
 438 Ultra-structural and rheological changes during gelation of giant squid (*Dosidicus*
 439 *gigas*) muscle. Z. Lebensm-Unters-Forsh. 202, 215-220.
- 440 GORNALL A.J., BARDAWILL C.J., and DAVID M.M. 1949. Determination of serum
 441 proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- 442 HAARD, N. F. 1994. Protein hydrolysis in seafoods. In: *Seafood Chemistry, Processing*
 443 *Technology & Quality* (F. Shahidi and J.R. Bolta eds.) pp 10-27, Blackie Academic &
 444 Professional. New York.
- 445 HALLET, C.L. and BREMNER, A.H. 1988. Fine structure of the myocommata muscle fiber
 446 junction in hoki (*Macruronus Novaczelandiae*). J. Sci. Food Agric. 44,245-262.

- 447 HAMEED, K.S. and HAARD, N.F. 1985. Isolation and characterization of cathepsin c from
 448 short finned squid *Illex illecebrosus*. Compl. Biochem. Physiol. 82B(2), 241-246.
- 449 HAMM, R. 1975. Water holding capacity of meat. In: *Meat* (D. J. A. Cole y R. A. Lawrie.
 450 Butterworths, eds.) pp 321-337, London, UK.
- 451 HUSS, H.H. 1999. *El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad*. FAO.
 452 Documento Técnico de Pesca 348. <http://www.fao.org/>. October 6, 2005.
- 453 INABA, T., SHINDO, N. and FUJII, M. 1976. Purification of cathepsin B from squid liver.
 454 Agric. Biol. Chem. 40, 1159-1165.
- 455 IWATA, K., KOBASH, K. and HASE, J. 1974. Studies on muscle alkaline protease.
 456 Comparison of physicochemical and enzymes properties of alkaline protease from
 457 white croaker and barracuda muscle with those of the enzyme from carp muscle. Bull.
 458 Jap. Soc. Scient. Fish. 40,1043-049.
- 459 JIANG, S.T. and LEE, T.C. 1985. Changes in free amino acids and protein denaturation of
 460 fish muscle during frozen storage. J. Agric. Food Chem. 3,839-844.
- 461 KIRSCHKE, H. and BARRETT, A.J. 1987. Chemistry of lysosomal proteases. In:
 462 *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown* (H. Glaumann and F.J. Ballard eds.) pp.
 463 193–238, Academic Press, New York.
- 464 KOLODZIEJSKA, I., SIKORSKI, Z. E. and SADOWSKA, M. 1987. Texture of cooked
 465 mantle of squid *illex argentinus* as influence by specimen characteristics and
 466 treatments. J. Food Sci. 52,932-935.
- 467 KOLODZIEJSKA, I., NIECIKOWSKA, C. AND SIKORSKI, Z.E. 1994 Dimethylamine and
 468 formaldehyde in cooked squid *Illex argentinus* muscle extract and mantle. Food
 469 Chem. 50,281-283.
- 470 KOLODZIEJSKA, I. and SIKORSKI, Z.E. 1996 Neutral and alkaline muscle proteases of
 471 marine fish and invertebrates. A Review. J. Food Biochem. 20,349-363.
- 472 KONNO, K. and FUKAZAWA, CH. 1993. Autolysis of squid mantle muscle protein as
 473 affected by storage conditions and inhibitors. J. Food Sci. 57,1198-1202.
- 474 KONNO K., YOUNG-JE C., YOSHIOKA T., SHINHO P. and SEKI N. 2003. Thermal
 475 denaturation and autolysis profiles of myofibrillar proteins of mantle muscle of jumbo
 476 squid *Dosidicus gigas*. Fishres Sci. 69, 204-209.
- 477 KUNGINO, M. and KUNGINO, K. 1994. Microstructural and rheological properties of
 478 cooked squid mantle. J. Food Sci. 59,792-796.
- 479 KUNITZ, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor, general properties. J. Gen. Physiol.
 480 30,291-310.

- 481 KUO, J.D., HULTIN, H.O., ATALLAH, M.T. and PAN, B.S. 1991. Role of collagen and
 482 contractile elements in ultimate tensile strength of squid mantle. J. Agric. Food
 483 Chem. 39,1149-1154.
- 484 LEBLANC, E. L. and GILL, T. A. 1982. Comparative Study of Proteolysis in Short Finned
 485 (*Illex illecebrosus*) and long finned (*Loligo pealei leseur*) squid. Compl. Biochem.
 486 Physiol. 73B, 201-210.
- 487 LIN, T. S. and LANIER, T.C. 1980. Properties of an Alkaline protease from the skeletal
 488 muscle of atlantic croaker. J. Food Biochem. 4,17.
- 489 LO PIERO, A.R., PUGLISI, I. and PETRONE, G. 2002. Characterization of "lettucine", a
 490 serine-like protease from *Lactuca sativa* leaves, as a novel enzyme for milk clotting.
 491 J. Agric. Food Chem. 50, 2439-2443.
- 492 MCLAY, R. 1980. Activities of cathepsins A and D in cod muscle. J. Sci. Food Agric. 31
 493 1050-1054.
- 494 MORALES-BOJORQUEZ, E. 2002. Comments about the relationship between
 495 temperature and giant squid catches. Ciencias Marinas. 28(2):211-221.
- 496 MORISHITA, T. 1974. Participation in digestion by the proteolytic enzymes of the posterior
 497 salivary gland in octopus-ii. isolation and purification of the proteolytic enzymes from
 498 the posterior salivary gland. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 40,601-607.
- 499 MORRISEY, M.T. WU, J.U., LIN, D.D. and AN, H. 1993. Protease inhibitors effects on
 500 torsion measurement and autolysis of pacific whiting surimi. J. Food Sci. 58,1050-
 501 1054.
- 502 MURRAY. P.D.1990. Maintaining protein stability. guide to protein. In Vol. 182 *Methods in*
 503 *Enzymology* (Murray P. Deutscher, ed.) pp. 83-89, Academic Press.
- 504 NAGASHIMA, Y., EBINA, H., NAGAI, T., TANAKA, M., and TAGUCHI, T. 1992 Proteolysis
 505 affects thermal gelation of squid mantle muscle. J. Food Sci. 57, 916-917/922.
- 506 NGAPO, T.; WTLKINSON, B.; CHONG, R. and HAISMAN, D. 1992. Gelation of ovine
 507 myofibrillar protein induced by 1,5-gluconolactone. Proceedings of the 38th ICOMST,
 508 Clermont-Ferrand, France, pp. 1095-1098.
- 509 NISHIMURA, T., HATTORI, A. and TAKAHASHI, K. 1994. Structural weakening of intra-
 510 muscular connective tissue during conditioning of beef. Meat Sci. 39,127-133.
- 511 OKAMOTO, Y., FUCHINO, O., HORIUCHI, S., TAMAYA, T., MATSUMOTO, J.J., and
 512 TSUCHIYA, T. 1993. Purification and characterization of matallo-proteinases from
 513 squid mantle muscle, myosinase I & II. Biochem Biophys Acta 1161,97-104.

- 514 OTWELL, W.S. and HAMANN, D. D. 1979. Textural characterization of squid (*Loligo*
515 *pealei* lesuer): scanning electron microscopy of cooked mantle. J. Food Sci. 44, 1692-
516 1636/1634.
- 517 OWEN, J. E., NUÑEZ, F. A., ARIAS, M. T. and CANO DE LOS RÍOS O. 1982. *Manual de*
518 *Prácticas de Cursos de Tecnología de la Carne*. Facultad de Zootecnia. Universidad
519 Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Mexico.
- 520 PACHECO, A. R., LUGO, S.M.E. and ROBLES, B.M.R. 2000. Postmortem biochemical
521 and functional characteristic of Monterrey sardine muscle storage at 0C. J. Food Sci.
522 65(1), 40-47.
- 523 PAREDI, M.E., DAVIDOVICH, L.A. and CRUPKIN, M. 1999. Thermally induced gelation of
524 squid (*Illex argentinus*) actomyosin. influence of sexual maturation stage. J. Agric.
525 Food Chem. 47,3592-3595.
- 526 PHILLIPS, L., SCHULMAN, W., and KINSELLA, J.E. 1990. pH and heat treatment effects
527 on foaming of whey protein isolate. J. Food Sci. 55,1116-1119.
- 528 PRICE, F.J. and SCHWEIGERT, B.S. 1994. *Ciencia de la carne y de los productos*
529 *cárnicos*, pp 125-129. 2nd Ed. Acibia, Zaragoza, Spain.
- 530 RAMÍREZ-OLIVAS R., ROUZAUD-SÁNDEZ, O., HAARD N., PACHECO-AGUILAR R.
531 AND EZQUERRA-BRAUER J.M. 2004. Changes in firmness and thermal behavior of
532 ice-stored muscle of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). Euro Food Res Tech. 219, 312-
533 315.
- 534 REDDI, P. K., CONSTANTINIDES, S.M. and DYMSZA H.A. 1972. Catheptic activity of fish
535 muscle. J. Food Sci. 37,643-648.
- 536 RODGER, G., WEDDLE, R. B., CRAIG, P. and HASTINGS, R. 1984. Effect of alkaline
537 protease activity on some properties of comminuted squid. J. Food Sci. 49:117-123.
- 538 SAGARPA (Secretary of Agriculture, Natural Resources and Fishing). 2004. Carta
539 Nacional Pesquera, Mexico. <http://www.sagarpa.gob.mx/conapesca/>. October 6, 2005
- 540 SAKAI, J. and MATSUMOTO, J.J. 1981 Proteolytic enzymes of squid mantle muscle.
541 Comp. Biochem. Physiol. 68B:389-395.
- 542 SAKAI, J., SAKAGUCHI, Y. AND MATSUMOTO, J.J. 1981 acid proteinase activity of squid
543 mantle muscle: some properties and sub-cellular distribution. Comp. Biochem.
544 Physiol. 40,791-794.
- 545 SATO, K., ANDO, M., KUBOTA, S., ORIGASA, K., KAWASE, H., TOYOHARA, H.,
546 SAKAGUCHI, M., NAKAGAWA, T., MAKINODAN, Y., OTHSUKI, K. and

- 547 KAWABATA, M. 1997. Involvement of type V collagen in softening of fish muscle
 548 during short term chilled storage. J. Agric. Food Chem. 45, 343-348.
- 549 SIGNORINI, M., PONCE, E. and GUERRERO, I. 2003. Proteolytic and lipolytic changes in
 550 beef inoculated with spoilage microorganisms and bio-protective lactic acid bacteria.
 551 Int J. Food Prop 6 (1),147-163.
- 552 SIKORSKI, Z.E., OLLEY, J. and KOSTUSH, S. 1976. Protein changes in frozen fish. Crit.
 553 Rev. Food Sci. Nut. 8(1),97-129.
- 554 SPSS, 1997. Professional Statistics Chicago: SPSS Inc.
- 555 TSUCHIYA, T., YAMADA, N. and MATSUMOTO, J.J. 1978, Extraction and purification of
 556 squid myosin. Bull. Jap. Soc. Scient. Fish. 44,175-179.
- 557 WASSON, D. H., BABBIT, J. K. and FRENCH, J. S. 1992. Characterization of a heat
 558 stable protease from arrow-tooth flounder; *Atheresthes stomias*. J. Aquat. Food Prod.
 559 Technol. 1,167-182.
- 560 YAMAGUCHI, T., YAMASHITA, Y., TAKEDA, I. and KISO, H. 1982 Proteolytic enzymes in
 561 green asparagus, kiwifruit occurrence and partial characterization. Agric. Biol. Chem.
 562 46,1983-1986.
- 563 ZAYAS, J.F. 1997a. Water holding capacity of proteins. In: *Functionality of Proteins in*
 564 *Food*. pp. 77, 81-84 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 565 ZAYAS, J.F. 1997b. Gelling properties of proteins. In: *Functionality of Proteins in Food*. pp.
 566 310 Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 567 ZEECE, M.G. and KATOH, K. 1989. Cathepsin D and its effects on myofibrillar proteins:
 568 A Review. J. Food Biochem. 13,157-1.

569 **Figure captions**

570

571 Figure 1. Effect of pH on the proteolytic activity of an enzyme extract of squid mantle muscle
572 (activity was carried out at 35C for 10 min, using 1% haemoglobin and casein as
573 substrate for acid and alkaline proteases, respectively). Error bars indicate
574 standard deviation of 3 replicates.

575

576 Figure 2. Effect of temperature on alkaline proteases activity of the enzyme extract of squid
577 mantle muscle (activity was carried out at 35C for 10 min using 1% casein as
578 substrate). Error bars indicate standard deviation of 3 replicates.

579

580 Figure 3. Effect of temperature on acid proteases activity of the enzyme extract of squid
581 mantle muscle (activity was carried out at 35C for 10 min using 1% hemoglobin).
582 Error bars indicate standard deviation of 3 replicates.

583

584 Figure 4. Variation of pH and water holding capacity (WHC) of squid mantle muscle during
585 storage at 4C. Error bars indicate standard deviation of 3 replicates.

586

587 Figure 5. Scanning electron micrographs of squid muscle stored at 4C for (a) 0, (b) 5 and (c)
588 9 days (4000x magnification, 8-10 kV).

589

590 Figure 6. Shear force of raw and cooked squid mantle stored at 4C for 9 days (using a
591 Warner-Bratzler cell fitted to a TA-XT2 texture analyzer). Means of 10 replicates
592 with different letters on the top of each column are significantly different ($p < 0.001$).

593

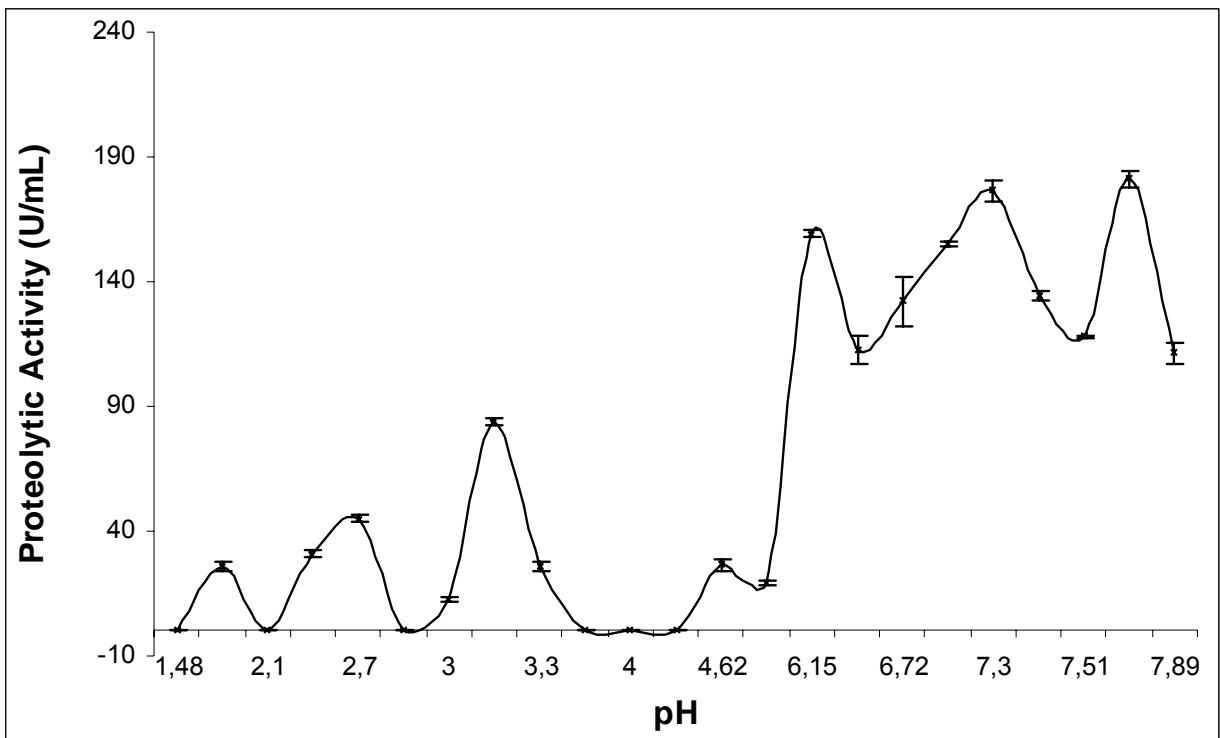
594 Figure 7. SDS-PAGE patterns of myofibrillar protein extracts of squid mantle muscle stored
595 at 4 C for 9 days (using 10% acrylamide separating gels and 4% stacking gels
596 containing 0.1% SDS).

597

598 Figure 8. Changes on strength of protein gels obtained from squid mantle muscle stored at
599 4C (70% penetration at 1 mm/sec, on a TA-XT2 texture analyzer fitted with a 49 N
600 load cell). Error bars indicate standard deviation of 10 replicates.

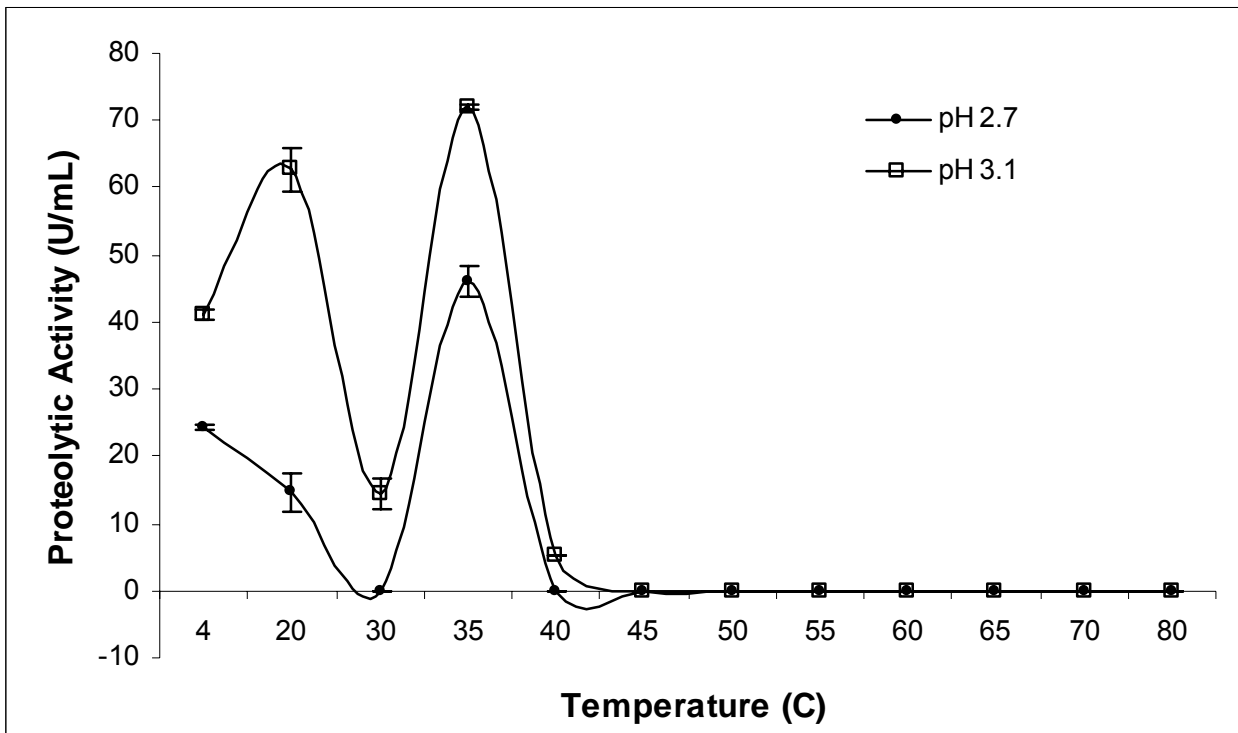
601

602
603
604
605
606
607
608



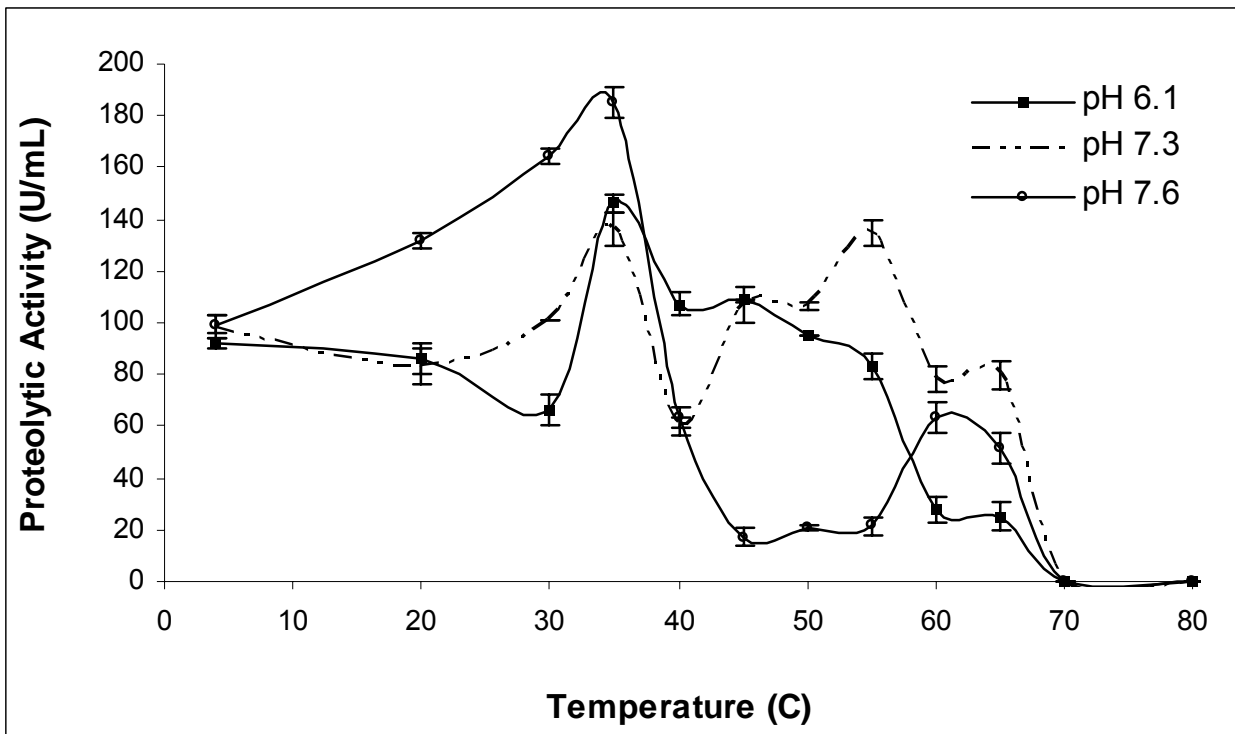
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620

621
622
623
624
625
626
627
628



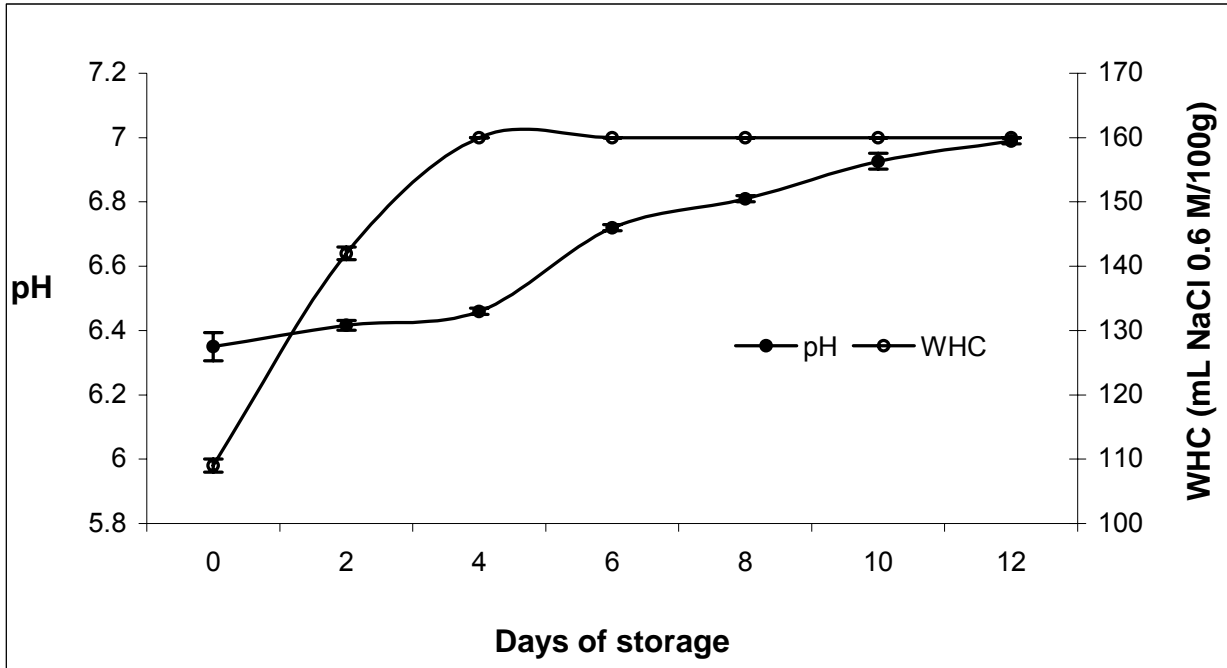
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639

640
641
642
643
644
645
646
647

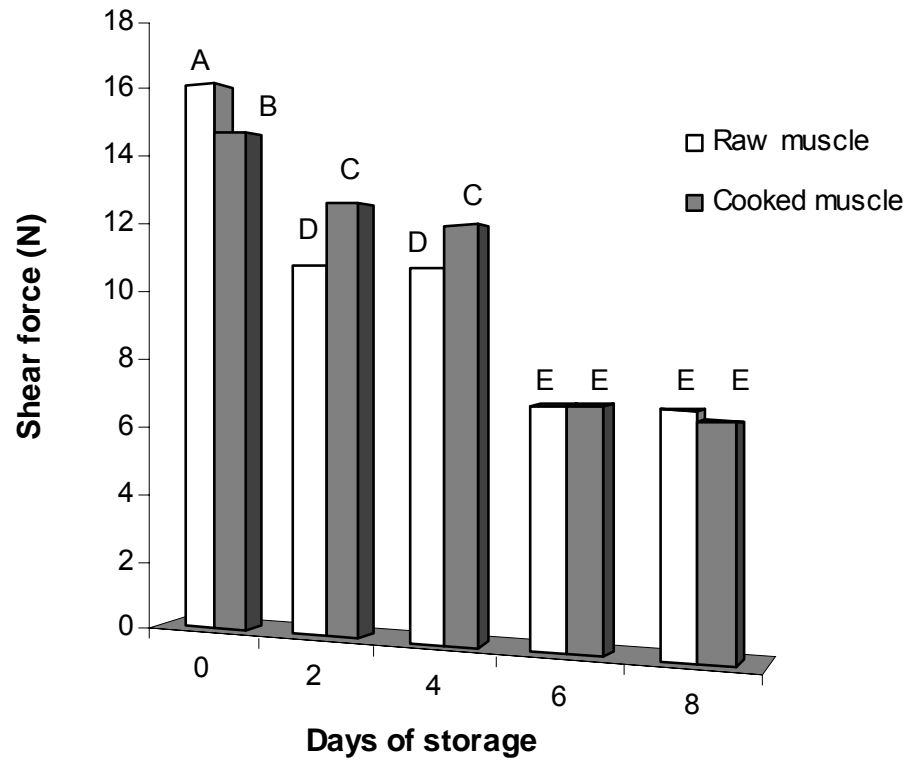


648
649
650
651
652
653
654
655
656
657

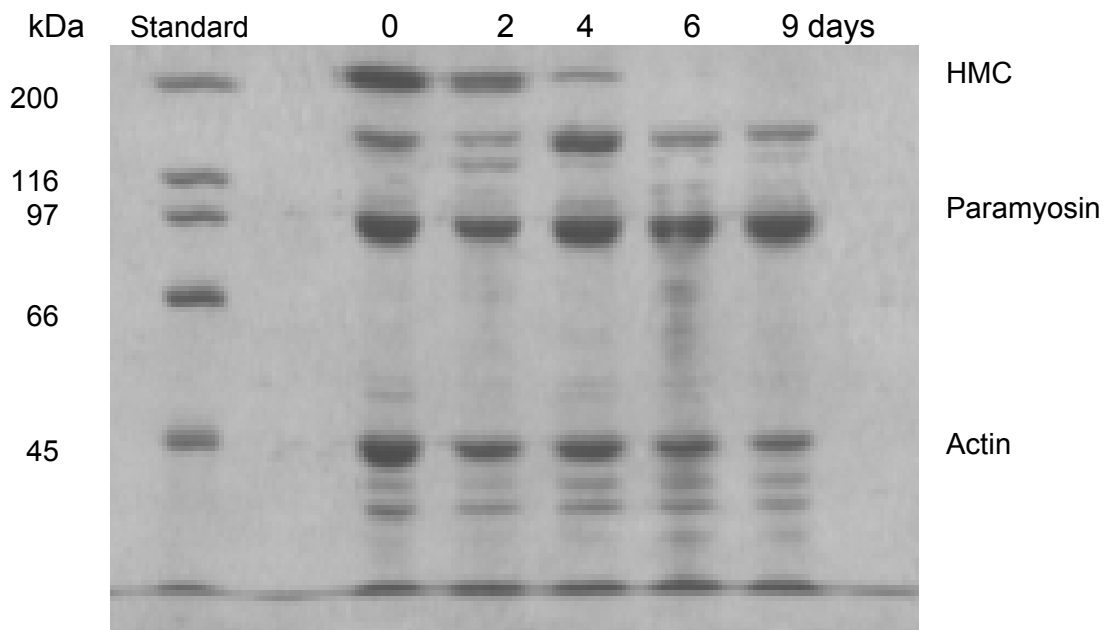
658
659
660



661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677



678

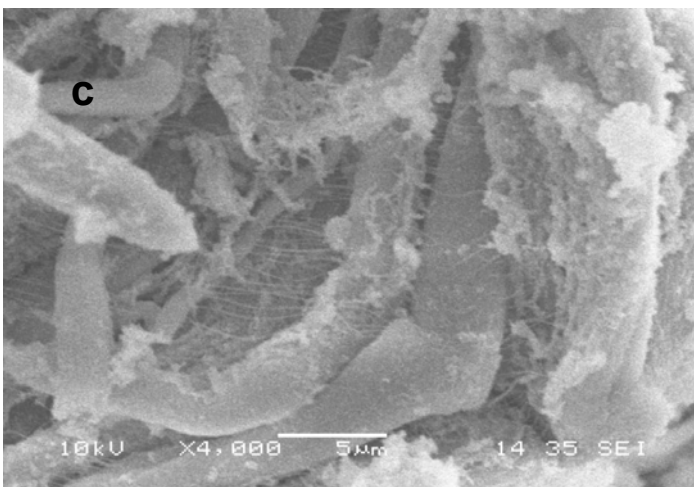
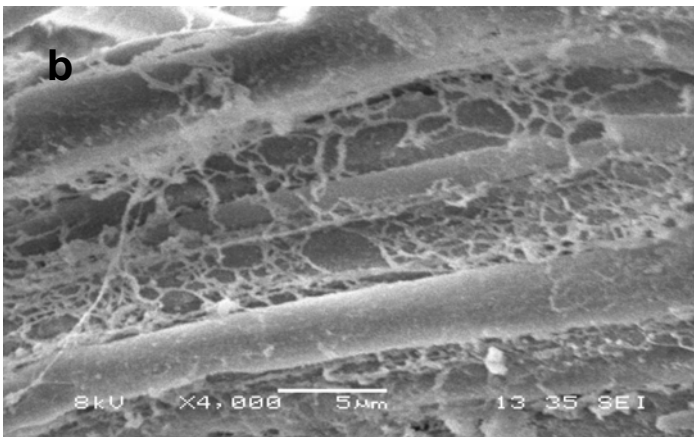
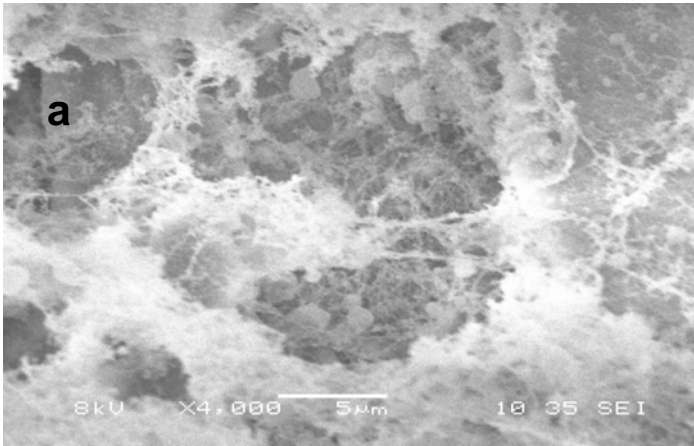


679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693

694

695

696



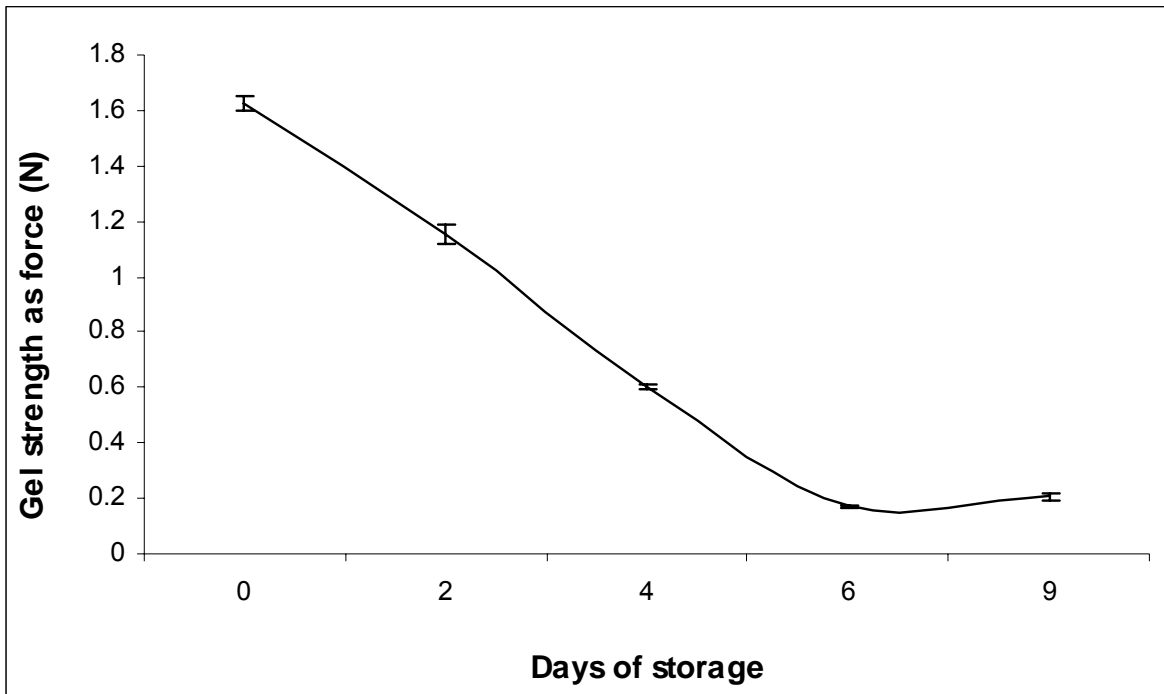
697

698

699

700

701
702
703
704
705
706
707
708



709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720

721

722

723 Table 1 – Effect of protease inhibitors on enzymatic activity of giant squid (*Dosidicus Gigas*)
724 muscle extract.

725

Inhibitor	Concentration	% residual activity
Control	--	100.00 ^A
PMSF	1 ^a	80.90 ± 0.72 ^C
EDTA	2 ^a	50.78 ± 0.88 ^F
Iodoacetic acid	5 ^a	70.84 ± 0.74 ^D
Pyrophosphate	10 ^a	51.43 ± 1.16 ^F
Pepstatin	10 ^b	12.39 ± 0.36 ^H
Leupeptin	10 ^b	31.69 ± 0.68 ^G
Trypsin inhibitor	0.25 ^b	57.54 ± 0.52 ^E
Chemostatin	20 ^b	92.73 ± 0.88 ^B

726 ^a mM

727 ^b µg/mL

728 ^{A-H} means with different uppercase letters are significantly different (p<0.001).

729 Data values are mean ± standard deviation of 3 replicates.

730

731

732

733

734

735

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
comunicación de los resultados que presentó:

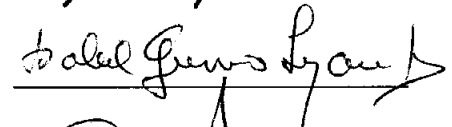
Octavio Dublán García

El día 5 de junio del 2006

Dra. Edith Ponce Alquicira
Biotecnología, UAM-I



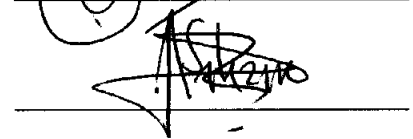
Dra. Isabel Guerrero Legarreta
Biotecnología, UAM-I



Dr. Ramón Cruz Camarillo
Microbiología, ENCB, IPN



Dr. Juan Alfredo Salazar Montoya
Biotecnología, CINVESTAV, IPN



Dr. Alfonso Totosaus Sánchez
TESE, Ecatepec

