



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA

“EFECTO DEL ALMACENAMIENTO EN CONGELACIÓN  
SOBRE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DEL  
MÚSCULO DE CALAMAR”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTAN:

CYNTHIA CASTELLANOS CARRASCO  
GERARDO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

MEXICO, D.F.



EXÁMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

2005

m345270



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Jurado asignado

Presidente  
Vocal  
Secretario  
1er. Suplente  
2º. Suplente

Zoila Nieto Villalobos  
Gabriela Alatorre García  
Edith Ponce Alquicira  
Juan Guzmán Calderón  
Jorge A. Flores Maldonado

## Sitio en donde se desarrolló el tema

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa  
Av San Rafael Atlixco No 186. Colonia Vicentina  
Iztapalapa, México, D.F.

## Asesor del tema

Dra. Edith Ponce Alquicira



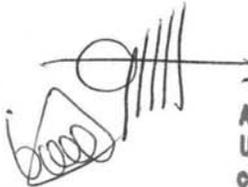
## Supervisor técnico

M en B. Octavio Dublán García

Octavio Dublán García

## Sustentantes

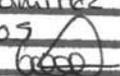
Cynthia Castellanos Carrasco  
Gerardo Hernández Ramírez



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gerardo Hernández Ramírez

FECHA: 10/06/05

FIRMA: 

## Agradecimientos

*Le doy gracias a mis padres por el infinito amor con el cual me impulsan y apoyan para ser mejor cada día, a mi hermano por caminar a mi lado y hacerme la vida más fácil, a Gerardo porque juntos hemos crecido como profesionistas y como personas.*

*A la Dra. Edith Ponce por su gran enseñanza durante este trabajo, al M en B. Octavio Dublán por su valiosa colaboración.*

*Al jurado sinodal por mostrar gran interés por este trabajo.*

Cynthia

*A mis papas por darme todo lo que con su amor estuvo a su alcance, a mis hermanos por haber creído en mí y apoyarme en todo momento.*

*A la familia Castellanos por su gran apoyo moral y el gran ejemplo de fortaleza, a Cynthi por ser gran parte de mis mejores momentos y éxitos.*

*A la Profa. Edith Ponce por su guía y paciencia y al jurado sinodal por tomarse el tiempo de hacer mejor este trabajo*

Gerardo

## INDICE

	Pág.
<b>1. JUSTIFICACION</b>	1
<b>2.OBJETIVO</b>	1
<b>3.ANTECEDENTES</b>	2
3.1 Características generales del calamar y volúmenes de captura, exportación y producción	3
3.2 Estructura y composición del músculo de pescado y mariscos	5
3.3 Composición proteica del músculo de los productos marinos	8
3.3.1 Proteínas sarcoplásmicas	8
3.3.2 Proteínas miofibrilares	9
3.3.3 Características de las proteínas miofibrilares	10
3.3.4 Proteínas del estroma	12
3.4 Enzimas	13
3.4.1 Proteasas	13
3.4.2 Actividad proteolítica	15
3.4.3 Efecto de las proteasas sobre el tejido muscular	20
3.4.4 Degradación de los compuestos nitrogenados	22
3.5 Conservación y manejo por congelación	23
3.5.1 Tipos de congelación	24
3.5.2 Métodos de congelación	25
3.5.3 Congelación en productos cárnicos y/o marinos	26
3.5.4 Efectos de la congelación en estructura y proteínas	26
3.5.5 Efecto del almacenamiento en congelación de las proteínas	27
3.5.6 Actividad enzimática de la óxido de trimetilaminasa (OTMAasa) relacionada con la desnaturalización de proteínas	28

	Pág.
<b>4. ACTIVIDADES</b>	<b>30</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b>	<b>31</b>
5.1 Preparación de las muestras	31
5.2 Determinación de proteína	31
5.3 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar	31
5.3.1 Electroforesis desnaturizante	31
5.4 Determinación de solubilidad de las proteínas presentes en el músculo de calamar	32
5.4.1 Extracción de actinomisina	32
5.4.2 Extracción con SDS. SDS y UREA, y SDS y Mercaptoetanol	32
5.4.3 Extracción de proteínas miofibrilares	33
5.6 Determinación de formaldehído	34
5.6.1 Extracción	34
5.6.2 Neutralización	34
5.7 Determinación de CRA	35
5.8 Determinación de pH	35
5.9 Determinación de pérdida de peso por deshielo	35
5.10 Determinación de pérdida de peso por cocción	36
5.11 Determinación de la actividad proteolítica del extracto crudo del manto del calamar	36
5.11.1 Obtención del extracto enzimático crudo del manto del calamar	36
5.11.2 Condiciones de temperatura y pH	37
5.12 Análisis estadístico	37
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>

	Pág.
6.1 Solubilidad	37
6.1.1 Proteína soluble en sal	37
6.1.2 Solubilidad en soluciones detergentes	40
6.1.3 Solubilidad de proteínas miofibrilares	44
6.2 Capacidad de retención de agua (CRA)	46
6.3 Variación del pH con respecto al tiempo de almacenamiento	48
6.4 Concentración de formaldehído	49
6.5 Pérdida de peso por deshielo y por cocción	51
6.6 Efecto del almacenamiento de sobre la actividad proteolítica	54
6.6.1 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar	55
6.6.2 Perfil electroforético de proteínas miofibrilares del extracto del músculo de calamar gigante	57
<b>7. CONCLUSIONES</b>	60
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	61
<b>9. ANEXOS</b>	70

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Representación de la anatomía general del calamar	4
Figura 2. Interpretación esquemática de la constitución tisular del manto del calamar ( <i>Loligo pealei</i> )	6
Figura 3. Corte transversal del músculo de pescados y mariscos	7
Figura 4. Representación esquemática de la miofibrilla muscular	7
Figura 5. Mecanismo de conversión de TMA y FA a partir de OTMA	29
Figuras 6. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante	57
Figura 7. Perfil electroforético de las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar almacenado a -20°	58

## LISTA DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Porcentaje de extracción de proteína soluble en disolución salina respecto al tiempo y temperatura de congelación	38
Gráfica 2. Variación del % de proteína soluble en SDS 2% respecto al tiempo y temperatura de congelación	40
Gráfica 3. Variación del % de proteína soluble en SDS 2% y urea 8M respecto al tiempo y temperatura de congelación	41
Gráfica 4. Variación del % de proteína soluble en SDS 2% y mercaptoetanol 5% respecto al tiempo y temperatura de congelación	43
Gráfica 5. Variación del porcentaje de solubilidad de proteínas miofibrilares respecto al tiempo y temperatura de congelación	45
Gráfica 6. Capacidad de retención de agua respecto al tiempo y temperatura de congelación	47
Gráfica 7. Variación del pH respecto al tiempo y temperatura de congelación	48
Gráfica 8. Variación de la formación de formaldehído respecto al tiempo y temperatura de congelación	50
Gráfica 9. Variación del porcentaje de pérdida de peso por deshielo respecto al tiempo y temperatura de congelación	52
Gráfica 10. Variación del porcentaje de pérdida de peso por cocción respecto al tiempo y temperatura de congelación	52
Gráfica 11. Efecto del almacenamiento a -20°C sobre la actividad proteolítica endógena del manto de calamar	55
Gráfica 12. Curva patrón para determinación de proteína por el método de biuret	71
Gráfica 13. Curva patrón para determinación de formaldehído	78

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Volúmenes de captura de productos	4
Tabla 2. Volumen de exportación de calamar	4
Tabla 3. Volumen de producto total y congelado de calamar	5
Tabla 4. Composición química del manto de calamar	8
Tabla 5. Distribución de las proteínas en el tejido muscular de los moluscos	9
Tabla 6. Clasificación y características de las proteínas miofibrilares	11
Tabla 7. Clasificación de las enzimas por I.U.B.	15
Tabla 8. Proteasas del tejido muscular	17
Tabla 9. Propiedades funcionales de las proteasas endógenas	20
Tabla 10. Cantidad de hielo formado en el músculo congelado a diferentes temperaturas	25
Tabla 11. Tiempo de agitación para cada disolución detergentes (SDS, SDS + UREA y SDS + $\beta$ -Mercaptoetanol)	33
Tabla 12. Variación de proteína soluble en sal respecto al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	39
Tabla 13. Variación de proteína soluble en sal respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	39
Tabla 14. Variación de proteína soluble en SDS respecto al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	40
Tabla 15. Variación de proteína soluble en SDS respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	41

	Pág.
Tabla 16. Variación de proteína soluble en SDS y urea respecto al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	42
Tabla 17. Variación de proteína soluble en SDS y urea respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	42
Tabla 18. Variación de proteína soluble en SDS y b-mercaptoetanol respecto al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	43
Tabla 19. Variación de proteína soluble en SDS y b-mercaptoetanol respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	44
Tabla 20. Variación del porcentaje de solubilidad de proteínas miofibrilares respecto al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	45
Tabla 21. Variación del porcentaje de solubilidad de proteínas miofibrilares respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	46
Tabla 22. Variación de la capacidad de retención de agua (CRA) respecto al tiempo y temperatura de congelación. Estadístico por medio de ANOVA	47
Tabla 23. Variación del pH al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	49
Tabla 24. Variación de la concentración de formaldehído respecto al tiempo y temperatura de congelación (Estadística por medio de ANOVA)	51
Tabla 25. Anova para la formación de formaldehído respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación	51
Tabla 26. Variación de la pérdida de peso por deshielo respecto al tiempo y temperatura de congelación. (Estadística por medio de ANOVA)	53

	Pág.
Tabla 27. Anova para pérdida de peso por deshielo respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación	53
Tabla 28. Variación de la pérdida de peso por cocción respecto al tiempo y temperatura de cocción. (Estadística por medio de ANOVA)	53
Tabla 29. Anova para pérdida de peso por cocción respecto a la interacción del tiempo y temperatura de congelación	54
Tabla 30. Pesos moleculares calculados del extracto crudo del manto del calamar gigante	56
Tabla 31. Límites de detección para la determinación de proteína por el método de biuret	72
Tabla 32. Reactivos Gel de separación (T=10%)	73
Tabla 33. Reactivos Gel de concentración (T=4%)	74
Tabla 34. Disoluciones de baja y alta fuerza iónica	76
Tabla 35. Límites de detección para la determinación de formaldehído	79

## 1. JUSTIFICACION

El cuatro de abril de 1998 en el puerto de Manzanillo, el presidente de México Ernesto Zedillo Ponce de León, acudió a las instalaciones del grupo marítimo industrial integrado por ocho empresas que generan 1,430 empleos directos, y que cuenta con ocho barcos, cuatro atuneros y cuatro calamareros, para dar el banderazo de salida a un convoy de camiones con contenedores que llevaban calamar que posteriormente se exportaría a España (El Nacional, 1998).

Pero hasta antes de esto la exportación de calamar capturado en las costas del pacífico mexicano, se encontraba vetada por las autoridades españolas, ya que el producto no cumplía con especificaciones de calidad requeridas (Hora Nacional, 1998).

El calamar es una de las muchas especies marinas que son desaprovechadas y poco consumidas nacionalmente, a pesar de ser una de las de más alta producción pesquera, ya que se obtienen anualmente alrededor de 49,348 toneladas de materia prima total; cantidad similar a la que se obtiene de camarón con 47,784 toneladas como lo muestra la Tabla 1, de este volumen de materia prima total, se disponen 38,267 toneladas en dos presentaciones principales 11,457 toneladas como producto fresco y 26,810 toneladas en producto congelado, ver Tabla 3 en donde se muestran los volúmenes de producto total y congelado de calamar (SEMARNAP 2001).

La mayor parte es exportada a otros países donde son aprovechados los beneficios tecnológicos y alimenticios de esta especie. Los volúmenes de exportación de calamar se observan en la Tabla 2.

## 2. OBJETIVO

Dado que el calamar se dispone o se comercializa casi en su totalidad como producto congelado, y al ser la mayor parte de este producto dedicado a la

exportación es necesario regular las condiciones de almacenamiento, particularmente el tiempo y temperatura de congelación, ya que de estos parámetros va a depender la buena conservación de la calidad de este producto marino. De aquí la importancia de realizar un estudio sobre las consecuencias que tiene el almacenamiento en congelación con respecto a las proteínas miofibrilares del músculo, que son los principales componentes responsables de la textura y de las propiedades funcionales, como son: la solubilidad de proteínas, capacidad de retención de agua, hidratación, jugosidad, etc.

### 3. ANTECEDENTES

#### Principales grupos de organismos explotados como alimentos

**A) Plantas marinas.** De todas las plantas marinas, las algas son las más importantes. Por lo común se clasifican en cuatro grupos principales, atendiendo a su pigmentación, que son: algas rojas o rodofíceas; pardas, feofíceas; verdes, clorofíceas; y azules-verdosas, cianofíceas.

**B) Crustáceos.** Los crustáceos constituyen el grupo más valioso de organismos marinos. El grupo más importante es el formado por las gambas y camarones. Otro importante y valioso grupo de crustáceos son los cangrejos.

Las langostas se consideran manjar selecto en todo el mundo, lo que justifica su elevado precio. Existen también enormes cantidades de pequeños crustáceos pelágicos *Euphausidacea*.

**C) Pescado.** Las diferentes especies de pescado explotado comercialmente están sujetas a amplias variaciones en lo referente a abundancia, disponibilidad de captura, distribución, tamaño y características biológicas.

**D) Moluscos.** Existen mas de 130,000 especies de moluscos, cuyo tamaño oscila entre unos pocos milímetros y más de dos metros. Los moluscos comestibles pueden dividirse en tres grupos principales los univalvos, que

exportación es necesario regular las condiciones de almacenamiento, particularmente el tiempo y temperatura de congelación, ya que de estos parámetros va a depender la buena conservación de la calidad de este producto marino. De aquí la importancia de realizar un estudio sobre las consecuencias que tiene el almacenamiento en congelación con respecto a las proteínas miofibrilares del músculo, que son los principales componentes responsables de la textura y de las propiedades funcionales, como son: la solubilidad de proteínas, capacidad de retención de agua, hidratación, jugosidad, etc.

### 3. ANTECEDENTES

#### Principales grupos de organismos explotados como alimentos

**A) Plantas marinas.** De todas las plantas marinas, las algas son las más importantes. Por lo común se clasifican en cuatro grupos principales, atendiendo a su pigmentación, que son: algas rojas o rodofíceas; pardas, feofíceas; verdes, clorofíceas; y azules-verdosas, cianofíceas.

**B) Crustáceos.** Los crustáceos constituyen el grupo más valioso de organismos marinos. El grupo más importante es el formado por las gambas y camarones. Otro importante y valioso grupo de crustáceos son los cangrejos.

Las langostas se consideran manjar selecto en todo el mundo, lo que justifica su elevado precio. Existen también enormes cantidades de pequeños crustáceos pelágicos *Euphausidacea*.

**C) Pescado.** Las diferentes especies de pescado explotado comercialmente están sujetas a amplias variaciones en lo referente a abundancia, disponibilidad de captura, distribución, tamaño y características biológicas.

**D) Moluscos.** Existen mas de 130,000 especies de moluscos, cuyo tamaño oscila entre unos pocos milímetros y más de dos metros. Los moluscos comestibles pueden dividirse en tres grupos principales los univalvos, que

sólo tienen una concha los bivalos con dos conchas y los cefalópodos. En el primer grupo se incluyen los caracoles terrestres y marinos, lapas y abalones en el segundo, las ostras, almejas y mejillones y en el tercero, calamares, sepias y pulpos. Los moluscos constituyen alrededor del 7% de las capturas mundiales totales y desempeñan importante papel en el mercado internacional.

### **3.1 Características generales del calamar y volúmenes de captura, exportación y producción**

Los moluscos son animales que poseen cuerpo blando con cabeza anterior, pie ventral y masa visceral, un gran número de éstos contienen una concha de carbonato de calcio. La gran mayoría son de vida libre y de tamaños muy variados. El nombre de molusco (*Moli, Molis o Molacos*) significa blando y es la característica común entre estos seres. (Vargas 1980).

El calamar gigante es un molusco carnívoro perteneciente a la clase Cefalópoda del orden de los dibranquios. Posee un cuerpo aerodinámico que le permite desplazarse con rapidez bajo el agua pertenecen a la misma clase que los nautilus como la jaiba y el pulpo. Se clasifica en el género *Architeutis* de la familia *Architeuthidae*. (Morales,1981).

El calamar es de cuerpo alargado y cabeza muy desarrollada, tiene diez tentáculos con ventosas. Los calamares habitan los mares de todo el mundo. Unos viven cerca de la superficie del agua y otros a grandes profundidades. El calamar gigante llega a medir hasta 19 metros y es un manjar muy preciado. En la Figura 1 se observa la anatomía general del calamar (Morales,1981).

Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo del calamar

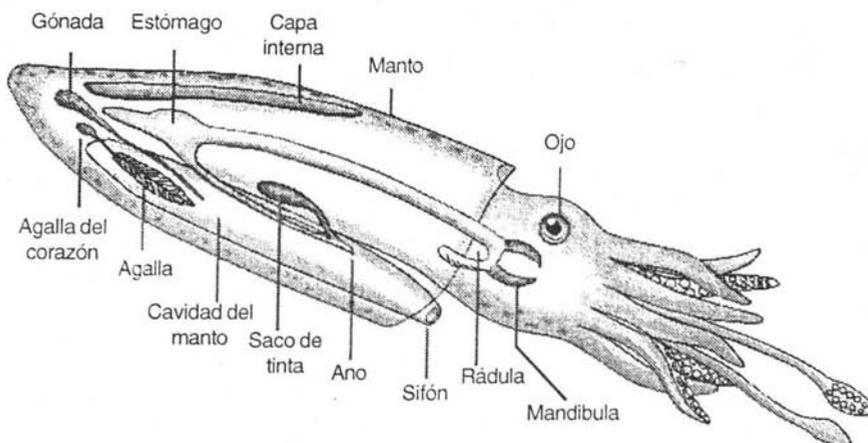


Figura 1. Representación de la anatomía general del calamar

TABLA 1. VOLÚMENES DE CAPTURA DE PRODUCTOS

Especie	Peso desembarcado (Tons.)	Peso vivo (Tons.)
Calamar	80, 660	108, 079
Camarón	61, 635	78, 879
Mojarra	91, 191	94, 279

(SEMARNAP, 2001)

TABLA 2. VOLUMEN DE EXPORTACIÓN DE CALAMAR

Especie	Volumen de exportación (Tons.)
Calamar	19, 957

(SEMARNAP, 2001)

TABLA 3. VOLUMEN DE PRODUCTO TOTAL Y CONGELADO DE CALAMAR

Especie	Total (Total)		Congelado (Tons.)	
	Materia prima	Materia obtenida	Materia prima	Materia obtenida
<b>Calamar</b>	49, 348	25, 429	49, 010	25, 250

(SEMARNAP, 2001)

### 3.2 Estructura y composición del músculo de pescado y mariscos

La principal parte comestible está constituida por los músculos corporales de mayor tamaño porque corresponden a los músculos laterales y se encuentran a ambos lados del cuerpo, son por lo general de tonalidad blanquecina, por lo cual se denominan músculos blancos u ordinarios. Los músculos subcutáneos contienen mucha mioglobina, recibiendo el nombre de músculo rojo u oscuro. La cantidad y distribución de la carne oscura en el cuerpo del pez es una característica de las diferentes especies (Zdzislaw, 1994).

Los músculos del pescado están constituidos por delgadas membranas de tejido conjuntivo -las denominadas miocomatas (miosepta)- en segmentos llamados miotomos. El grosor de las miocomatas depende de la especie, edad, longitud. El número de miotomos corresponde con el de las vértebras de la columna vertebral. Cada miotomo está compuesto por numerosas fibras musculares. Las fibras musculares suelen tener una longitud inferior a 20 mm, y de 0.02 a 1.0 mm de diámetro. Cada fibra está rodeada de una membrana llamada sarcolema, que contiene finas fibrillas colágenas, las cuales se unen con las miocomatas en la unión miotomo-miocomata (Zdzislaw, 1994).

En el calamar la porción comestible corresponde al manto. El cual está formado por tejido muscular cubierto por tunicas de tejido conectivo. Las fibras musculares son estriadas y cubiertas por un sarcolema (membrana) delgado y constituyen el 98% de la capa muscular las fibras musculares no corren

a lo largo del eje del manto; algunas forman bandas circulares (0.1 a 0.2 mm de espesor) y otras son radiales (0.0010 a .015 mm). Estas últimas conectan las tunicas del tejido conectivo.

Las fibras musculares constituyen hasta el 98% del grosor de la capa muscular, lo forman bandas de láminas circulares (0.1 a 0.2 mm de grosor) incluidas entre láminas finas radiales (0.0010 a 0.015 mm). Cada fibra contiene en la periferia un número de miofibrillas. El centro está ocupado por el sarcoplasma con las mitocondrias y el núcleo. El diámetro medio de la fibra muscular es de 3.5  $\mu\text{m}$ . La capa de fibras musculares está situada entre las tunicas externas e interna de tejido conectivo; las fibras de la lámina radial se conecta con las tunicas. En la Figura 2 se muestra la constitución tisular del manto de calamar (Otwell y Giddings, 1980).

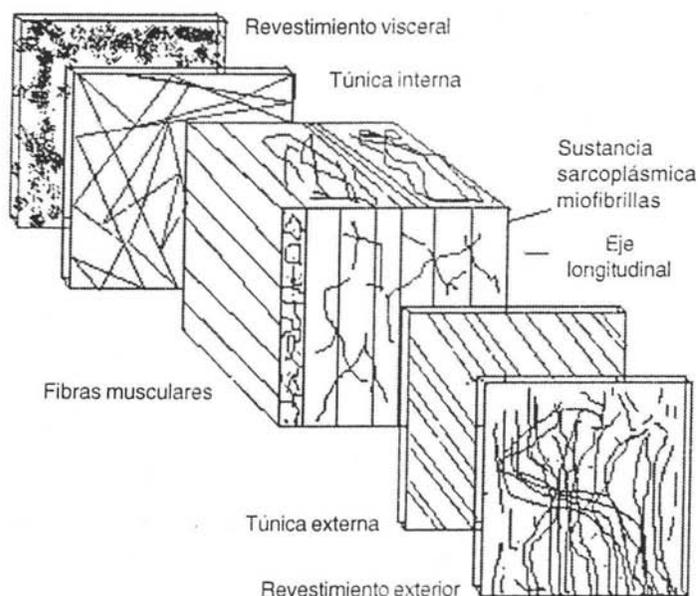


Figura 2. Interpretación esquemática de la constitución tisular del manto del calamar (*Loligo pealei*). (Otwell y Giddings, 1980)

Una fibra muscular contiene todos los componentes típicos de las células de un organismo eucariótico. La mayor parte del volumen celular está ocu-

pado por las miofibrillas, cada una hasta de 5 micrómetros de diámetro, que corren al paralelo al eje longitudinal de la fibra. Las miofibrillas están segmentadas en sarcómeros, constituidos por miofilamentos delgados y gruesos y limitados por líneas Z. Las interacciones de los miofilamentos son la base de la concentración muscular y de la rigidez que adquiere el cuerpo *post mortem* (Zdzilaw, 1994). En la Figura 3 podemos observar el corte transversal del músculo de pescados y mariscos y en la Figura 4 se observa la representación esquemática de la miofibrilla.

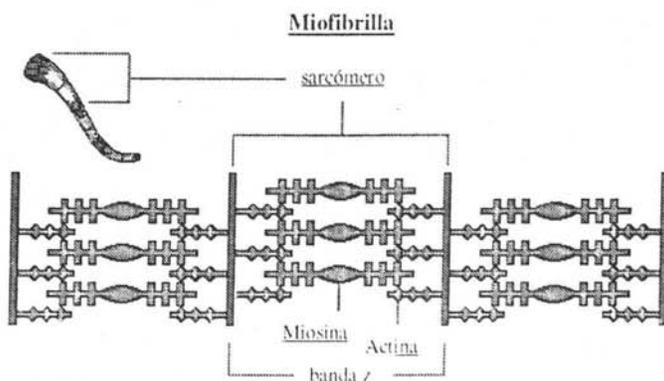


Figura 3. Corte transversal del músculo de pescados y mariscos

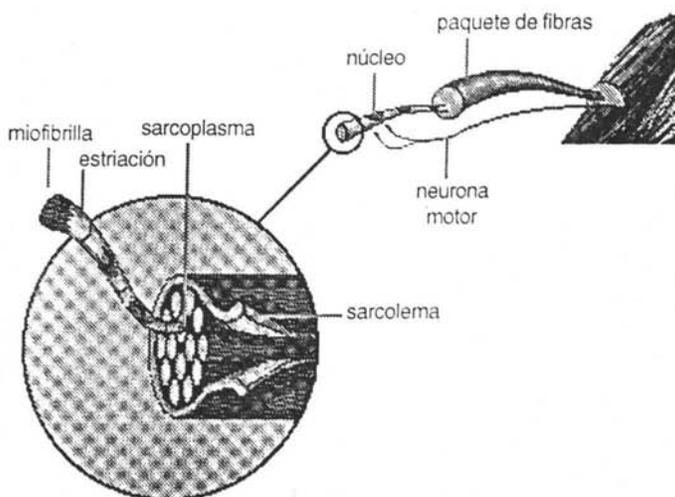


Figura 4. Representación esquemática de la miofibrilla muscular

### 3.3 Composición proteica del músculo de los productos marinos

El tejido muscular del calamar en fresco contiene principalmente agua, siendo la proteína el segundo componente en mayor cantidad y de gran importancia como se observa en la Tabla 4. Composición química del manto de calamar.

TABLA 4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL MANTO DE CALAMAR

Porcentaje (%)	
Humedad	79.9
Proteína	19.0
Grasa	1.43
Cenizas	1.4

(Gómez y col. 1997)

A diferencia de los pescados y otros invertebrados que contienen generalmente entre el 11 y el 24% de proteína, el tejido muscular de los moluscos está constituido por varios grupos de proteínas: las que forman la fracción sarcoplásmica, que desempeñan las funciones bioquímicas en las células; las proteínas miofibrilares del sistema contráctil; y las proteínas de los tejidos conjuntivos o estromas, responsables principalmente de la integridad de los músculos. En la Tabla 5, se observa la distribución de las proteínas en el tejido muscular. (Badui, 1999.)

La cantidad obtenida de cada una de estas fracciones se ve afectada por las condiciones de la extracción, principalmente por las técnicas de triturado, entremezclado y centrifugación, valor del pH, concentración salina, y dilución, así como por el grado de desnaturalización y pérdida de la solubilidad de las proteínas debidos al almacenamiento y procesado del molusco (Zdzislaw, 1994).

**3.3.1 Proteínas sarcoplásmicas.** El término de proteínas sarcoplásmicas comprende generalmente a las proteínas del sarcoplasma, las integrantes

del líquido extracelular y las proteínas contenidas en las diminutas partículas del sarcoplasma. La fracción soluble realmente intracelular constituye hasta el 90 al 95% de las proteínas totales del extracto obtenido mediante homogeneización del tejido muscular con agua o disoluciones de sales neutras con una fuerza iónica inferior a 0.15M. Las proteínas sarcoplásmicas también son solubles en disoluciones salinas más concentradas. Por lo general, la fracción sarcoplásmica consta de hasta un 30% de la cifra total de proteína presente en los músculos del pescado y los moluscos (Lewin,1974).

TABLA 5. DISTRIBUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL TEJIDO MUSCULAR DE LOS MOLUSCOS

	Base húmeda (%)	Base seca (%)
<b>Sarcoplásmicas o solubles</b>		
Enzimas	6.0	30.0
Mioglobina	0.6	3.0
Otras	0.4	2.0
Total	7.0	35.0
<b>Contráctiles o miofibrilares</b>		
Miosina	5.0	25.0
Actina	2.5	12.5
Paramiosina	1.4	7.0
Otras	1.1	5.5
total	10.0	50.0
<b>Del estroma o insolubles</b>		
Colágena y reticulina	1.5	7.5
Elastina	0.1	0.5
Otras insolubles	1.4	7.0
Total	3.0	15.0

(Badui, 1999.)

**3.3.2 Proteínas miofibrilares.** Estas proteínas son las que forman estructuralmente el tejido muscular y las que transforman la energía química en mecánica durante la contracción y relajación del músculo, además de que participan en la rigidez que experimenta el músculo *post-mortem*. El resultado de mantener por largo tiempo en congelación a las proteínas miofibrilares es el endurecimiento de la carne.

Las proteínas miofibrilares también son responsables de la capacidad del músculo para retener agua, de la textura de los productos pesqueros, así como de las propiedades de los homogeneizados y picados, en particular de la capacidad para formar gel. Las proteínas miofibrilares son la porción proteica más abundante ya que representan el 70% de las proteínas totales, son solubles en soluciones salinas concentradas dentro de las cuales se encuentran principalmente la miosina, la paramiosina y la actina (Konno y Fukazawa, 1993).

Estas proteínas pueden ser extraídas con soluciones salinas de sales neutras con una fuerza iónica superior a 0.15, por lo común oscilando entre 0.30 y 1.0 seguida de una precipitación con una dilución 1/10 del obtenido por centrifugación con agua destilada, constituye del 40 al 60% de la cantidad total de nitrógeno. En la Tabla 6 se muestra la clasificación y características de las proteínas miofibrilares.

**3.3.3 Características de las proteínas miofibrilares.** Las características de las proteínas miofibrilares comprenden los siguientes elementos: Miosina, Paramiosina, Actina y otras proteínas miofibrilares.

*Miosina.* La miosina constituye hasta el 50 al 58% de la fracción miofibrilar, es un hexámero con una estructura helicoidal con un 55% de hélice  $\alpha$ , integrada por dos cadenas fibrosas rígidas semejantes enrolladas entre sí, que terminan en una doble cabeza, asociadas a su vez con cuatro cadenas polipeptídicas. El peso molecular es de 480 000 Da, es rica en lisina y en ácido glutámico. La miosina se puede extraer del tejido muscular picado en sólo 1 a 3 minutos, mientras que otros componentes, en particular la actina, requieren tiempos de extracción mucho más largos. La extracción y purificación de la miosina del manto de calamar es un proceso difícil, debido a la gran actividad de las catepsinas, baja resistencia de la miosina del calamar al ataque proteolítico y a su contaminación con paramiosina. La miosina tiene actividad de ATPasa que es activada no sólo por  $\text{Ca}^{2+}$ , sino también ligeramente por el  $\text{Mg}^{2+}$ , alcanzando su máxima actividad con dos pH diferentes; a 30°C, la inactivación de la CaATPasa es muy rápida (Badui, 1999).

*Paramiosina.* La paramiosina está presente en los músculos estriados y lisos de los invertebrados y ha sido extraída de diversas especies de moluscos.

TABLA 6. CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES

	Peso molecular	Contenido (kDa)	Localización (%)	
<b>Contráctiles</b>				
Miosina		500	42	Banda A
Actina		43	22	Banda I
<b>Reguladoras mayores</b>				
Tropomiosina		(33 kDa) x 2	5	Banda I
Troponina		70	5	Banda I
<b>Reguladoras menores</b>				
Proteína M		165	2	Banda A
Proteína C		135	2	Banda A
Proteína H		69	<1	Banda A
Proteína F		121	<1	Banda A
Proteína I		50	<1	Banda A
Proteína X		152	<1	Banda A
β-actinina		35	<1	Fin de banda I
γ-actinina		35	<1	Banda I
<b>Filamentos intermedios</b>				
Desmina		53	1	Periferia de miofibrillas
Vimentina		55	1	Entre discos Z
Filamentos elástico		2 x 10 <sup>9</sup> 10		Unión A-I
conectina				
<b>Discos Z</b>				
a-actinina		(95 kDa) x 2	2	Discos Z
Proteína Z		50	<1	Discos Z
Eu-actinina		43	<1	Discos Z
Proteína 34 K		34	<1	Discos Z
ABP (filamina)		(250 kDa) x 2	<1	Discos Z
<b>Otras proteínas</b>				
Vinculina		130	<1	Sarcolema
Nebulina		800	3	Banda I
Paramiosina		34	<1	Unión A-I

(Badui, 1999.)

En el músculo de calamar, la paramiosina constituye hasta el 14 % de las miofibrillas. (Badui, 1999).

*Actina.* La actina, segunda proteína miofibrilar de importancia que puede extraerse del polvo desecado con acetona de la fracción miofibrilar purificada, se encuentra en la forma monómera llamada actina G (actina globular con un peso molecular de 46 000 Da). Se polimeriza en presencia de sales neutras para convertirse en actina filamentosa F. Cuando la carne de pescado triturada se trata con disoluciones de sales neutras, la actina se extrae en unión de miosina en forma de actomiosina. Este compuesto exhibe las características de la ATPasa activada por  $\text{Ca}^{2+}$ , igual que sucede con la miosina, pero también se ve activado por el  $\text{Mg}^{2+}$  (Badui, 1999).

*Otras proteínas miofibrilares.* Existe cierto número de otras proteínas presentes en la estructura de las miofibrillas y en las interacciones de las proteínas contráctiles, que en total suponen algo más del 10% de la fracción miofibrilar; estas proteínas son la tropomiosina y las troponina (Badui, 1999).

**3.3.4 Proteínas del estroma.** Representan el 3% de las proteína total, compuesto por las principales proteínas del tejido conjuntivo (colágeno y elastina), por reticulina y agregados desnaturalizados de proteínas miofibrilares (Zdzislaw, 1994).

El colágeno es el más abundante constituido por diversas fracciones, conteniendo 33% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina y 10% de hidroxiprolina, siendo deficiente en aminoácidos indispensables; el calamar contiene los aminoácidos mencionados (Kimura, 1969). El tropocolágeno, monómero de colágeno, es una molécula de forma cilíndrica integrada por tres cadenas polipeptídicas que se enrollan a lo largo de un eje para producir una triple hélice, enlazándose entre sí a través de las uniones intermoleculares cruzadas que le confieren gran rigidez a la estructura y solubilidad muy baja, y a su vez con la interacción de las moléculas de tropocolágeno son producidas fibras que dan origen al colágeno propiamente dicho.

La elastina es una proteína de los ligamentos capaz de formar fibras con elasticidad similar a la de la goma, constituye la mayor parte de las sustancia que forman los ligamentos de los mamíferos y está presente en grandes

cantidades (hasta el 60% de la proteína total) en las paredes de los vasos sanguíneos y en pequeña concentración de la piel (Badui, 1999).

### 3.4 Enzimas

Son proteínas globulares (cadena plegada estrechamente de modo que adoptan formas esféricas) compuestas generalmente de dos a más subunidades que se mantienen unidas por enlaces no covalentes.

Sus formas las proveen de uno o más sitios activos. El sitio activo es el dominio donde los enlaces compatibles del sustrato forman un complejo enzima-sustrato esto ocasiona un cambio conformacional en la estructura tridimensional de la enzima, liberando uno o más productos y quedando libre el sitio activo una vez más para poder ligar otra molécula de sustrato.

Son los catalizadores biológicos responsables de sostener casi todas las reacciones químicas que mantienen la homeostasis animal.

Actualmente se agrupan dentro de seis clases funcionales por la Unión Internacional de Bioquímicos (IUB): en la Tabla 7 se muestra la clasificación de las enzimas por la IUB.

**3.4.1 Proteasas.** Las enzimas proteolíticas o proteasas hidrolizan los enlaces peptídicos con diferente grado de intensidad y de selectividad. Son de los grupos más importantes en la industria de los alimentos.

Las proteasas son clasificadas se acuerdo a su origen que puede ser (Badui, 1999):

<i>Vegetal</i>	(papaína, ficina y bromelina)
<i>Animal</i>	(catepsina, tripsina y quimotripsina)
<i>Microbiano</i>	(subtilina)

También son clasificadas de acuerdo a su acción catalítica como:

*Endopeptidasas.* (Carboxipeptidasa A, Carboxipeptidasa B, Carboxipep-

tidasa C, Carboxipeptidasa Y, Aminopeptidasa de leucina, Aminopeptidasa M) *Exopeptidasas*. (Tripsina, Quimotripsina, Elastasa, Termolisina, Pepsina, Endopeptidasa V8)

Las principales categorías de las proteasas son:

<i>Serinproteasas</i>	(tripsina, quimiotripsina, elastasa)
<i>Tioproteasas</i>	(papaina, proteasa B de la levadura)
<i>Ácido proteasas</i>	(pepsina, catepsina d)
<i>Metaloproteasas</i>	(colagenasa, algunas proteasas microbianas neutras)
<i>Carbopeptidasas</i>	(remueve residuos C-terminales)
<i>Peptidasas</i>	(en su mayor parte remueven residuos N-terminales)

De las cuales las cuatro principales categorías de interés en alimentos son las proteasas endógenas siguientes, serinproteasas, tioproteasas, metaloproteasas y acidoproteasas. (Whitaker, 1972).

*Serinproteasas* (a excepción de algunas proteasas de la especie *Streptomyces*). Tienen su máxima actividad a pH alcalino. (Whitaker, 1972).

*Tioproteasas*. Están cercanamente relacionadas con las serinproteasas teniendo un -SH en lugar de un -OH en el centro catalítico. Estas enzimas las cuales se encuentran en plantas y también producidas por microorganismos son sensibles en presencia de oxígeno. Su máxima actividad es encontrada a valores de pH más neutros que las serinproteasas. (Whitaker, 1972).

*Metaloproteasas*. Contienen un átomo metálico esencial, usualmente Zn, y tienen un valor óptimo de pH aproximadamente neutro. Su estabilidad es incrementada con la presencia de  $Ca^{2+}$ , mientras que fuertes agentes quelantes, tal como el EDTA, inhiben a la enzima por la remoción del átomo de zinc. (Whitaker, 1972).

*Acidoproteasas*. Tienen un grupo carboxilo del ácido aspártico en el centro activo. Estas son esparcidas (extendidas) y tienen su máxima actividad catalítica a pH ácido (Whitaker, 1972).

TABLA 7. CLASIFICACIÓN DE LAS ENZIMAS POR IUB

Clasificación	Propiedades Bioquímicas
<b>Oxidoreductasas</b>	Actúan sobre muchas agrupaciones químicas para agregar o quitar átomos de hidrógeno
<b>Transferasas</b>	Transfieren grupos funcionales entre moléculas donadoras y aceptadoras
<b>Hidrolasas</b>	Adicionan agua a través de los puentes hidrolizándolos
<b>Liasas</b>	Agrega agua, amonio o dióxido de carbono a través de los dobles enlaces o quita estos elementos para dar lugar a los dobles enlaces
<b>Isomerasas</b>	Hay diferentes tipos de isomerización L y D.
<b>Ligasas</b>	Catalizan reacciones en las cuales dos grupos químicos se unen usando la energía del ATP.

(Badui, 1999.)

El músculo contiene diversos tipos de proteasas. Su cantidad en el tejido muscular es pequeña, lo que dificulta su purificación. Asimismo, las propiedades fisicoquímicas y catalíticas de una enzima de una especie dada, pueden variar con la edad biológica, dieta, actividad, temperatura del hábitat y por otros factores (Whitaker, 1972).

**3.4.2 Actividad proteolítica.** Uno de los principales problemas del deterioro de los productos marinos es la pérdida de textura que está directamente relacionada con la actividad proteolítica endógena. Algunas de las proteasas implicadas en este proceso son las catepsinas, proteasas dependientes de calcio, colagenasas, proteasas alcalinas, enzimas digestivas y otras proteasas musculares. Para incrementar la vida de anaquel de este tipo de sustratos se hace necesario encontrar la actividad autolítica y asegurar un medio higiénico y temperaturas de refrigeración y congelación. (Badui, 1999).

De los tipos de proteínas presentes en las proteínas miofibrilares (Tabla 6), la proteólisis de la fracción miofibrilar es la de mayor importancia en el proceso de conservación y elaboración de productos marinos. El tejido muscular contiene un gran número de proteasas, las calpains y las proteasas neutras activadas por calcio (CANP) y catpepsinas o proteasas lisosomales que tienen actividad específica por la fracción miofibrilar. (Badui, 1999).

La actividad de estos dos grupos de enzimas es responsable de la resolución del *rigor-mortis*; sin embargo su actividad puede variar con la especie, por la presencia de reguladores e inhibidores, por las condiciones ambientales. En la transformación *post-mortem* del músculo ocurren un sinnúmero de cambios químicos. Estos se inician al momento de la captura, en la que ocurre un paro masivo respiratorio y cardiaco, originan cambios en la actividad metabólica del músculo, iniciándose la actividad enzimática *post-mortem* y las reacciones de maduración y autólisis (Zdzislaw, 1994).

Durante las 6 a 12 horas posteriores a la pesca, el molusco presenta un ablandamiento progresivo. El ablandamiento mecánico de las miofibrillas es causado por efecto de las enzimas proteolíticas activadas después de la muerte. Estas endopeptidasas se han clasificado como no lisosomales con una actividad máxima a valores de pH cercanos a la neutralidad, y las lisosomales que actúan a valores menores de pH, como se muestra en la Tabla 8.

El manejo que se dé al animal antes del sacrificio, o en el músculo *post-mortem* puede tener un efecto profundo en la actividad de las enzimas endógenas que actúan para producir ablandamiento *post-mortem*.

Se ha reportado que los mecanismos responsables para el ablandamiento de la carne son los mismos en todos los músculos, y en todas las especies animales (Jaarseld, 1997).

Tal ablandamiento se lleva a cabo mediante la acción de las enzimas proteolíticas, tales como las catpepsinas y las calpains; a pesar de que los valores de pH para su máxima actividad son diferentes del pH de la carne *post-rigor*, se ha encontrado que ambos grupos de enzimas mantienen al-

guna actividad al pH normal de la carne *post-rigor*, por lo que a ambos grupos de enzimas se les ha atribuido la mejora en la blandura de la carne.

TABLA 8. PROTEASAS DEL TEJIDO MUSCULAR

Proteasas	Intervalo de pH para proteolisis
<b>No lisosomales</b>	
Proteasas neutras activadas por calcio	6.5-8.0
Proteasas similares a tripsina (serina)	6.5
Proteasas neutras (tilo)	6.5
Proteasas alcalinas (serinas)	7.5-10.5
<b>Lisosomales</b>	
Catepsina B	3.0-6.0
Catepsina D	2.5-4.5
Catepsina H	5.0-7.0
Catepsina L	3.0-6.0
Catepsina N	3.0-6.0

(Whitaker, 1972)

La actividad de las proteasas en el músculo de pescado es variada y depende de la localización en el músculo, el ciclo de vida, la presencia de activadores e inhibidores endógenos, pH, y temperatura. Recientes estudios indican que las proteasas neutras y alcalinas tienen más impacto sobre el deterioro *post-mortem* 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 (Kolodziejaska y Sikorski, 1996).

Cuando el calamar muere entra en un estado incontrolable de degradación proteica, tanto por proteasas endógenas como bacterianas (Eileen y Gill, 1982), por lo cual es posible que las proteasas endógenas que se encuentran en esta especie, sean las causantes de esta autólisis, y la subsecuente destrucción de la textura durante el almacenamiento, cocción o procesamiento (Ebina y col., 1995).

Las proteasas endógenas del músculo se incluyen en dos grupos, las dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (PDC) llamadas calpainas, y las lisosomales llamadas catepsinas.

*Calpainas.* A las proteasas involucradas en este tipo de actividad se les ha dado varios nombres, tales como proteasas dependientes del calcio (PDC) (Dayton, y col., 1976), proteasa neutra dependiente del calcio, o proteasa activada por el calcio (Koochmaraie y col., 1992). Estos términos fueron unificados por Suzuki y Murachi quienes les dieron el nombre de calpainas (citado por Sorimachi y col., 1996; Dransfield y col., 1992).

Existen dos tipos de calpainas: Calpaina I y Calpaina II. La I requiere concentraciones milimolares de  $\text{Ca}^{2+}$  mientras que las de tipo II requieren concentraciones micromolares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Carballo y López, 1991).

El pH óptimo de actividad es de 7.5, aunque se ha visto que tienen un 30 % de actividad al pH de la carne *post-rigor* (Lawrie, 1985; Alarcón y Dransfield, 1990).

Las enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  o calpainas, son cisteín proteasas con dos subunidades, una pesada (80 kDa) y una ligera (30 kDa) (Koochmaraie, 1992). La subunidad pesada contiene un dominio homólogo a otras cisteín proteasas como la papaina y las catepsinas B, L y H; la subunidad ligera no tiene una función conocida, aunque se cree que es una subunidad reguladora (Yoshizawa y col., 1995) idéntica para ambas calpainas y que presenta un cambio significativo en el peso molecular después de que ejerce su actividad proteolítica de 30 kDa a 17 kDa (Croall y col., 1992).

La subunidad pesada se divide estructuralmente en cuatro dominios, el segundo dominio es una cisteín proteasa y el cuarto dominio es un ligador de calcio (Reddy y col., 1994). Las funciones del primer y tercer dominio no son conocidas, aunque la estructura del dominio indica claramente que la subunidad pesada fue generada por fusión de genes ancestrales de proteasas (Sorimachi y col., 1994).

Una de las características especiales de las calpainas es que la gran exposición al calcio favorece la auto hidrólisis de sí mismas (Koochmaraie, 1990).

*Catepsinas.* Se ha demostrado que las proteasas del músculo son importantes en el desarrollo de la blandura y calidad de la carne durante la maduración después del sacrificio. Estudios recientes muestran que las enzimas individuales pueden contribuir al rompimiento de las miofibrillas y de las estructuras del tejido conectivo (Toldrá y Etherington, 1988).

Se ha demostrado que en diversos tejidos existen partículas denominadas lisosomas que contienen enzimas con actividad proteolítica óptima a pH ácido, entre ellas se encuentran las catepsinas reconocidas por su participación en el ablandamiento *post-mortem*. Los lisosomas tienen membranas lipoproteicas que se hallan intactas a los niveles de pH *post-mortem* o cuando el tejido sufre una lesión grave, liberando las enzimas proteolíticas.

Las concentraciones de lisosomas varían en diferentes células y tejidos. Las propiedades de las proteasas lisosomales de estos tejidos son similares (Pérez y Alarcón, 1996).

Las enzimas lisosómicas o catepsinas se activan a pH ácidos, degradan la membrana lisosómica y pasan al líquido sarcoplásmico, degradando las proteínas musculares. Se han reportado alrededor de 13 enzimas lisosomales, pero sólo se ha demostrado la presencia de ocho (A, B, C, D, H, L, J y carboxipeptidasa lisosomal) en músculo esquelético, siendo las catepsinas B, D, H y L las mejor caracterizadas (Koohmaraie, 1990).

Por otra parte, 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 la catepsinas B, P y E en el tejido del calamar, asimismo una proteinasa cisteína ácida, y una catepsina en *Ommanastrephe sloani*, así como metaloproteasas neutras de algunas especies como *Teuthoidea* y proteasas alcalinas de *Loligo forbesi* (Ebina y col., 1995). Otros estudios reportan que el extracto del manto del calamar de la especie *Illex illecebrosus*, contiene una enzima clorada activa la cual cataliza reacciones característica de la catepsina C. (Hameed y Hard, 1985).

También se han aislado y caracterizado catepsina C del hígado y páncreas del calamar *Illex illecebrosus* y catepsina D de la glándula digestiva del cala-

mar *Todarodes sagittatus*. La concentración de la enzima en la glándula es aproximadamente de 0.5 mg/g de peso seco (Kolodziejska y col., 1994).

Encontramos también 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. (Ashie y col., 1996).

TABLA 9. PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS PROTEASAS ENDÓGENAS

Enzimas	Forma de acción	PM (peso molecular kDa)	PI (punto isoeléctrico)	PH	Substratos
Catepsina D	Endo	42.000	5.5-6.5	3-5	Actina Miosina Troponina T Linea Z
Catepsina H	Endo Exo	28.000	7.1	5.5-6.5	Actina Miosina
Catepsina L	Endo	24.000	5.8-6.1	4-6.5	Actina Miosina $\alpha$ actinina Troponina T Troponina I Colágena
Calpaina I y II	Endo	30.000 30.000 (dos subunidades)		6. 5-8	Desmina Troponina T Troponina I Tropomiosina Conectina

(Carballo y López, 1991, Beynon y Bond, 1994)

**3.4.3 Efecto de las proteasas sobre el tejido muscular.** Después de la captura y muerte del molusco, éste sufre inmediatamente un deterioro debido a que ocurre una liberación de sus propias enzimas. Así, por ejemplo, las proteasas comienzan la hidrólisis de las proteínas musculares, lo que se

traduce en un ablandamiento lento en los diferentes organismos (Carballo y López, 1991), la velocidad de degradación es más elevada en los productos marinos que en otros tipos de carne (Oliveira, 1998).

En los productos de la pesca podemos determinar tres estadios *post-mortem*:

*Estadio de irritabilidad o de pre-rigor.* Este estadio comprende el periodo que va desde la muerte hasta que comienza el *rigor mortis*. En esta etapa denotamos excitabilidad muscular marcada. Empieza la glucólisis anaerobia, con acumulación de ácido láctico y degradación del ATP a ADP y otros nucleótidos. El pH del músculo se encuentra en valores cercanos a 7. A la palpación, se nota un músculo elástico.

*Estadio de rigor mortis o de rigidez cadavérica.* Esta etapa comienza cuando los valores de pH del músculo llegan a su valor mínimo. Aquí los sarcómeros se encuentran contraídos y existe una formación irreversible de actomiosina. Se caracteriza este estadio, porque el músculo se torna rígido y duro por la contracción de las proteínas miofibrilares. El pH del músculo se encuentra en el entorno de seis. El rigor comienza en la región de la cabeza, propagándose luego, a la región de la cola, desapareciendo luego en el mismo sentido que se instala. Este estado comienza de una a siete horas *post-mortem* y su duración es variable, de acuerdo a varios parámetros como pueden ser estado de fatiga, reservas de glucógeno, estado reproductivo, estado nutricional, etc.

*Estadio de alteración o de post-rigor.* Se inicia cuando el músculo empieza a ablandarse nuevamente. En esta etapa, se produce la liberación de catepsinas, las que degradan a las proteínas. Como resultado de esta acción enzimática sobre las proteínas estructurales del músculo, se verá facilitada la actividad microbiana.

Si se toma en cuenta lo anteriormente expuesto, se puede ver que el músculo del pescado atraviesa por los estadios de irritabilidad, *rigor mortis* y alteración. Una vez finalizado el *rigor mortis*, comienzan a instalarse los procesos que llevan a la putrefacción del producto.

A diferencia de las carnes rojas, los productos marinos, no pasan por un estado de maduración tan prolongado, estando este entre el *rigor mortis* y la putrefacción (Oliveira, 1998).

**3.4.4 Degradación de los compuestos nitrogenados.** La degradación de estos compuestos produce alteraciones organolépticas importantes en el pescado. Para una mejor comprensión de los mecanismos que aquí intervienen, se pueden dividir en las alteraciones sufridas por el nitrógeno proteico y las que suceden sobre el nitrógeno no proteico (Oliveira, 1998).

*Nitrógeno proteico.* Los cambios autolíticos de las proteínas son debidos a la acción de catepsinas. Éstas producen la degradación (hidrólisis) de las proteínas hasta péptidos y a aminoácidos. El aumento de la concentración de aminoácidos libres en el músculo, constituye un medio adecuado para el crecimiento bacteriano. Por la acción enzimática de estas bacterias ocurre la descarboxilación de algunos aminoácidos, originando de esta manera aminas biogénicas, que se acumulan o entran en los restos del proceso de putrefacción. Estos productos finales van a influir fundamentalmente en el olor que se percibe durante el examen organoléptico. Entre los compuestos finales de la degradación de los aminoácidos, están los siguientes:

- La arginina da como producto final  $\text{NH}_3$  (por una desaminación).
- La histidina da como producto final histamina (por una descarboxilación).
- La lisina da como producto final cadaverina (por una descarboxilación).
- La glutamina da como producto final putresina (por una descarboxilación).

Tiene importancia evitar la formación de histidina, ya que este compuesto actúa como mediador en las reacciones alérgicas Tipo 1. En especies como los atunes, que poseen una elevada concentración de histidina, es particularmente importante evitar el ataque microbiano, que conducirá a su descarboxilación, mediante un correcto enfriado (Oliveira, 1998).

*Nitrógeno no proteico.* Los organismos marinos tienen presente el óxido de trimetilamina, compuesto con funciones de osmoregulador, que por reducción bacteriana se convierte en trimetilamina y por acción enzimática (no necesariamente bacteriana), se reduce a dimetilamina, monometilamina y amoníaco. Todos estos compuestos son volátiles y se les conoce como ba-

ses nitrogenadas volátiles totales (BNVT). Sus bajos niveles en una muestra analizada indica la frescura del producto, cuanto más fresco esté más bajos serán los valores de BNVT. Los métodos empleados para la determinación de estos compuestos son el de microdifusión de Conway, el de destilación directa y el de destilación por arrastre de vapor. Los compuestos nitrogenados no proteicos tienen un valor adicional y juegan un papel importante en las características organolépticas del pescado, ya que son los responsables del «olor a pescado» debido a la trimetilamina. Por otra parte se le atribuyen efectos secretorios positivos para los jugos gástricos, preparando al tracto digestivo para digerir los alimentos. La trimetilamina y la dimetilamina se producen mediante la degradación enzimática del óxido de trimetilamina, que se encuentra en cantidades significativas únicamente en las especies de agua salada. La determinación de estos compuestos tiene amplia aplicación práctica, ya que son indicadores de frescura, (Oliveira, 1998).

La calidad sensorial y nutricional de cualquier producto marino se deteriora durante el congelamiento, acompañada por una pérdida en las propiedades funcionales de proteínas musculares. La extensión de la desnaturalización por frío durante el almacenamiento, es afectada por el contenido y distribución de grasa en los tejidos, así como por la tasa de acumulación de formaldehído y diferentes aminoácidos (Kolodziejaska y col., 1994).

### **3.5 Conservación y manejo por congelación**

Congelar alimentos consiste en la reducción de la temperatura por debajo del punto de congelación, de manera que la mayor parte del agua contenida en el alimento se transforma en hielo. Los alimentos congelados deben almacenarse hasta su consumo a temperatura de congelación, cuyo valor depende de la clase, del género y del tiempo de conservación deseado (Mallet, 1993).

El proceso de congelación representa una fuerte agresión a la estructura de los alimentos frescos. El agua contenida en ellos se separa del resto de los componentes en forma de hielo, del mismo modo que en la desecación se separa en forma de vapor; la única diferencia consiste en que los cristales de hielo permanecen en los alimentos y necesitan espacio, mientras el vapor de agua se disipa en la atmósfera.

Por lo tanto, al descongelar, el hielo puede reabsorberse por el resto del tejido, pero congelación y descongelación no son procesos reversibles y la unión del agua es más débil después de la congelación que en estado fresco, lo que motiva que el jugo pueda extraerse por presión con mucha más facilidad después de la congelación.

Por consiguiente, los componentes sólidos sufren por congelación ciertas modificaciones irreversibles que, por lo que se refiere a las proteínas de los alimentos animales, sufren una desnaturalización (Villanua, 1990).

La carne tiene un punto de congelación próximo a  $-1^{\circ}\text{C}$ ; en la mayor parte de los pescados, el punto de congelación va de  $-0.6$  a  $3.0^{\circ}\text{C}$ .

La baja actividad de agua ( $a_w$ ) de la fase líquida en el pescado congelado, junto a la concentración de los solutos debida a la formación de hielo, así como la baja temperatura de almacenamiento, inhiben la actividad bacteriana y ejercen cierto efecto letal sobre algunos microorganismos (Villanua, 1990).

**3.5.1 Tipos de congelación.** La velocidad de congelación, es decir, del movimiento que sigue el frente de hielo, ocasiona los cambios histológicos en los tejidos congelados, ya que origina el tamaño y distribución de los cristales de hielo. Durante la congelación lenta, de unos  $0.2$  cm/h, la velocidad de formación de hielo es menor que la de migración de agua desde el interior de las células (donde la concentración de solutos es inicialmente mayor) hasta los espacios intracelulares (donde la concentración inicial de sal es más baja), pero aumenta en el curso de la congelación debido a la cristalización. Así, en el músculo congelado lentamente, se forman cristales de hielo grandes en los espacios intercelulares, mientras que con velocidades elevadas de congelación, de  $5$  cm/h, un gran número de cristales pequeños se distribuyen uniformemente por toda la superficie de sección del tejido. La formación de grandes cristales de hielo en los espacios intercelulares puede causar daños en la estructura histológica del músculo. En la tabla 10 podemos encontrar la cantidad de hielo formado en el músculo congelado a diferentes temperaturas (Villanua, 1990).

TABLA 10. CANTIDAD DE HIELO FORMADO EN EL MÚSCULO CONGELADO A DIFERENTES TEMPERATURAS

Temperatura (°C)	Hielo (%)	Temperatura (°C)	Hielo (%)
0	0	-8	82
-1	8	-9	83
-2	52	-10	84
-3	66	-12	86
-4	73	-15	87
-5	77	-20	89
-6	79	-30	90
-7	81	-40	90

(Careche y col., 1999)

**3.5.2 Métodos de congelación.** Para elegir el método de congelación apropiado se debe de tomar en cuenta, en primer lugar, tamaño, forma y especie del pescado o partes del mismo a congelar, y después, situación y capacidad de las instalaciones con que se cuenta (Mallet, 1993).

Los métodos de congelación pueden ser: congelación por medio de aire enfriado, congelación por contacto directo y congelación por inmersión.

*Congelación por medio de aire enfriado.* Se usa el efecto combinado de temperaturas bajas y velocidades de aire altas lo que produce una transferencia de calor del producto. En general se debe de tener la consideración que el aire puede circular libremente alrededor de todas las partes del producto. Los productos de congelación rápida son de mejor calidad que los de congelación lenta por los siguientes motivos: Los cristales de hielo formados en la congelación rápida son pequeños por lo que causa menos daños a las células de los productos congelados.

*Congelación por contacto directo.* Por lo general el producto es colocado en congeladores que contienen placas metálicas a través de las cuales circula un refrigerante. La transferencia de calor es principalmente por conducción debido a lo cual la eficiencia del congelador depende de la cantidad de superficie de contacto (Mallet, 1993).

*Congelación por inmersión.* Se introduce el producto en una disolución de salmuera a bajas temperaturas (puede usar NaCl o azúcar). Esta disolución es un buen conductor, hace contacto con todo el producto, provocando una transferencia de calor rápida y el producto es congelado totalmente en poco tiempo, lo mejor es congelar en unidades pequeñas o individuales y no en forma masiva. Una desventaja de utilizar este método es la extracción de los jugos del producto por diferencias de concentración. También puede existir una penetración excesiva de sal en el producto, provocando cambios en el sabor (Mallet, 1993).

**3.5.3 Congelación en productos cárnicos y/o marinos.** Muchas especies de productos marinos no se procesan antes de su congelación, sin embargo, las formas más comunes para congelar pescado son: el fileteado y el desmenuzado. Los crustáceos se preparan principalmente cociéndolos, retirándoles la envoltura quitinosa y categorizando las carnes, aunque hay algunos que se congelan crudos.

Los moluscos pueden congelarse con concha o desprovistos de ella. Los calamares se congelan en bloques, enteros o después de ser descabezados y eviscerados (Zdzilaw, 1994).

**3.5.4 Efectos de la congelación en estructura y proteínas.** La congelación, como sabemos, es un proceso mediante el cual los alimentos conservan sus características originales durante un periodo de tiempo relativamente largo, ya que se inhibe el crecimiento de microorganismos y se disminuye la velocidad enzimática de algunas enzimas como las proteasas. Sólo que el almacenamiento en congelación puede provocar profundas alteraciones en las proteínas de la carne del manto calamar, conocidas con el nombre de desnaturalización por congelación.

Estos cambios comprenden tanto la desnaturalización propiamente dicha, o sea, el desdoblamiento de las moléculas, como las reacciones secundarias

que se producen entre los grupos químicos con capacidad de reacción de diferentes proteínas y de otros componentes de los músculos de los pescados, lo que origina combinaciones diversas (enlaces cruzados) y la formación de agregados. Las proteínas pierden por lo menos parte de su solubilidad y pueden exhibir una actividad enzimática más baja (Lewin, 1974).

### **3.5.5 Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas.**

Las proteínas pueden desnaturalizarse durante el almacenamiento, principalmente por la acción catalítica del hielo y sales inorgánicas, la fijación de ácidos grasos y productos de la oxidación de los lípidos, los enlaces cruzados inducidos por el formaldehído generado en los músculos de algunas especies marinas, y otras reacciones posibles que llevan a la formación de nuevos enlaces covalentes en las proteínas desnaturalizadas (Lewin, 1974).

La cristalización del hielo puede alterar las estructuras acuosas que rodean las áreas de interacciones hidrofóbicas en las proteínas. También puede romper las interacciones hidrofóbicas-hidrofílicas intermediadas por el agua, que contribuyen a afianzar la conformación nativa de las moléculas de proteína (Lewin, 1974). Aumentando la concentración de sales en los espacios acuosos sin congelar, puede disminuir la hidratación de las proteínas, ya que entonces los iones inorgánicos concentrados entran en competencia por las moléculas de agua. Los cationes divalentes son capaces de formar enlaces cruzados al reaccionar con cadenas laterales de ácidos ionizados en las proteínas. Estas interacciones se pueden favorecer por los ligeros desvíos que experimenta el pH en los productos marinos congelados. Por adición, las sales inorgánicas pueden participar en la desnaturalización por congelación de las proteínas catalizando la hidrólisis y autooxidación de los lípidos (Kolodziejaska y col, 1987).

Los ácidos grasos libres reducen notablemente la solubilidad de las proteínas miofibrilares en sistemas modelos. En el pescado congelado se acumulan durante el almacenamiento y pueden contribuir a la formación de agregados fijándose a proteínas a través de interacciones hidrofóbicas. Su papel es más acentuado en pescados magros que en la carne de pescado ligeramente grasa. En los músculos de pescado con depósitos grasos intramusculares, los ácidos grasos libres pueden tener una mayor dificultad para interactuar con las proteínas, porque se asocian preferentemente

con la fase lipídica, sin embargo, en el calamar debido a que la cantidad de grasa es baja no hay degradación y/o oxidación de grasas.

Los ácidos grasos oxidados y los productos secundarios de la autooxidación, especialmente aldehídos, alteran la solubilidad de la proteína mucho más que los ácidos, ya que pueden formar enlaces covalentes con grupos proteícos reactivos.

Otros enlaces covalentes que podrían favorecer la agregación proteica son los puentes disulfuro. Aunque no se han detectado cambios significativos en el número de grupos -SH en las proteínas del pescado como consecuencia de la congelación y de un almacenaje prolongado, podrían producirse algunos enlaces cruzados sin ningún cambio considerable en el total de grupos -SH (Kolodziejaska y col, 1987).

**3.5.6 Actividad enzimática de la óxido de trimetilaminasa (OTMAasa) relacionada con la desnaturalización de proteínas.** El óxido de trimetilamina (OTMA) es un compuesto presente naturalmente en muchos animales marinos. Se cree que su papel fisiológico es similar a la función de la urea o del ácido úrico en los mamíferos terrestres; su excreción mantiene el balance de nitrógeno.

Los invertebrados marinos tienen niveles elevados de OTMA. Los calamares contienen 728-884 mg/100g. En los músculos congelados de algunas especies de pescados, el OTMA se degrada hasta trimetilamina (TMA) y formaldehído (FA). En la Figura 5 se muestra el mecanismo de conversión de TMA y FA a partir de OTMA.

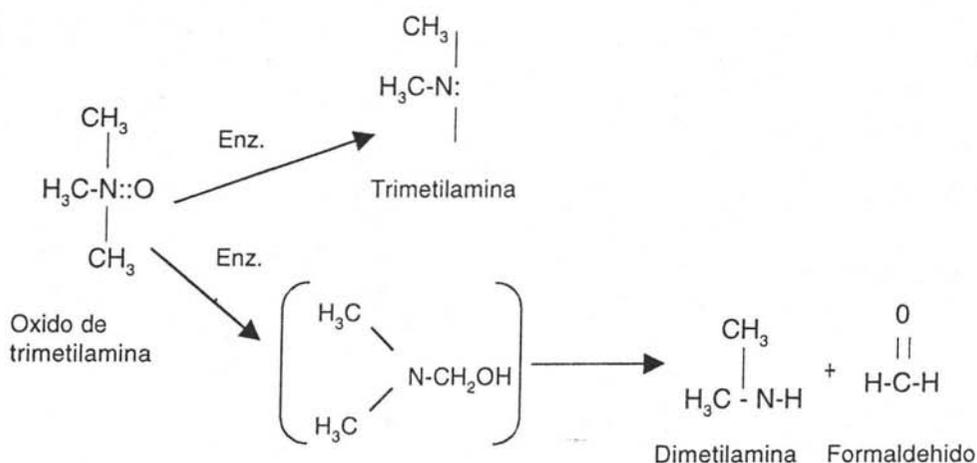
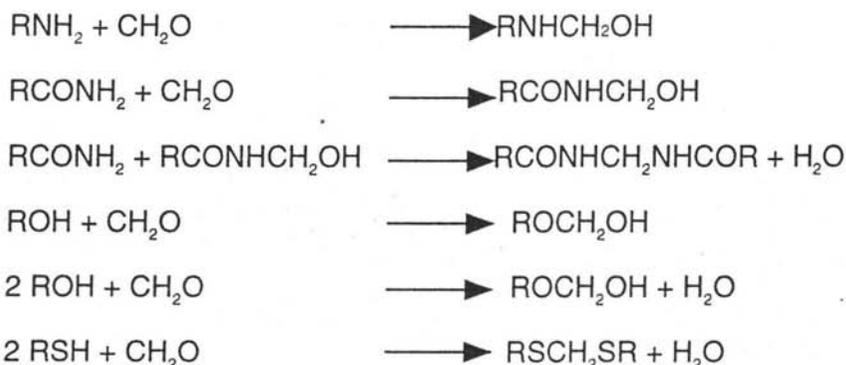


Figura 5. Mecanismo de conversión de TMA y FA a partir de OTMA (Harada, 1975)

La acumulación de aldehído durante el almacenamiento en congelación, por tratarse de un compuesto muy reactivo que se sabe reacciona con diferentes grupos funcionales de las proteínas, puede fijarse a algunos grupos de cadenas laterales proteicas y formar puentes metilénicos intra e intermoleculares, como:



Estas reacciones pueden provocar la formación de agregados proteicos y pueden disminuir la solubilidad proteica. El formaldehído es especialmente importante en la desnaturalización por congelación de las proteínas. Su acción es más notable en el producto marino desmenuzado que en piezas

enteras o filetes. Eliminando el sustrato hidrosoluble y el sistema enzimático responsable del desdoblamiento del OTMA, pueden atenuarse eficazmente los cambios indeseables sufridos por las proteínas. Por otra parte, el descenso de la concentración de OTMA en la carne de pescado puede a su vez contribuir a la desnaturalización por congelación, ya que el OTMA puede actuar en el músculo del pescado como osmolito protector.

El pH del medio tiene gran importancia en los fenómenos de desnaturalización de proteínas. La mayoría de las proteínas tienen un intervalo de pH y los valores que se aparten de él, provocan la desnaturalización. A medida que el pH del medio se aleja del valor óptimo, aumentan las cargas en los grupos R y también las que ejercen repulsión entre diferentes zonas de la molécula. Esto comparte la modificación de la estructura, aunque si estos cambios no son excesivos, la proteína puede adquirir de nuevo su configuración normal cuando se reestablece el valor de pH óptimo

Altas concentraciones de solutos (6 a 8 M), tales como urea o guanidina, son capaces de ocasionar la rotura de enlaces de H y, en último término la desnaturalización de las proteínas. (Harada, 1975).

#### 4. ACTIVIDADES

- Evaluar la solubilidad proteica de músculo de calamar congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de ocho meses. Haciendo una extracción de proteínas solubles en sal, SDS, Urea y Mercaptoetanol.
- Estudiar el efecto de la congelación en el pH y CRA de músculo de calamar congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- Determinar la pérdida de peso de músculo congelado, después de cocción y deshielo.
- Evaluar la actividad proteolítica endógena del músculo de calamar durante el almacenamiento en congelación.

enteras o filetes. Eliminando el sustrato hidrosoluble y el sistema enzimático responsable del desdoblamiento del OTMA, pueden atenuarse eficazmente los cambios indeseables sufridos por las proteínas. Por otra parte, el descenso de la concentración de OTMA en la carne de pescado puede a su vez contribuir a la desnaturalización por congelación, ya que el OTMA puede actuar en el músculo del pescado como osmolito protector.

El pH del medio tiene gran importancia en los fenómenos de desnaturalización de proteínas. La mayoría de las proteínas tienen un intervalo de pH y los valores que se aparten de él, provocan la desnaturalización. A medida que el pH del medio se aleja del valor óptimo, aumentan las cargas en los grupos R y también las que ejercen repulsión entre diferentes zonas de la molécula. Esto comparte la modificación de la estructura, aunque si estos cambios no son excesivos, la proteína puede adquirir de nuevo su configuración normal cuando se reestablece el valor de pH óptimo

Altas concentraciones de solutos (6 a 8 M), tales como urea o guanidina, son capaces de ocasionar la rotura de enlaces de H y, en último término la desnaturalización de las proteínas. (Harada, 1975).

#### 4. ACTIVIDADES

- Evaluar la solubilidad proteica de músculo de calamar congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  durante un periodo de ocho meses. Haciendo una extracción de proteínas solubles en sal, SDS, Urea y Mercaptoetanol.
- Estudiar el efecto de la congelación en el pH y CRA de músculo de calamar congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- Determinar la pérdida de peso de músculo congelado, después de cocción y deshielo.
- Evaluar la actividad proteolítica endógena del músculo de calamar durante el almacenamiento en congelación.

- Evaluar la degradación de la fracción miofibrilar de músculo congelado mediante sus perfiles electroforéticos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Preparación de las muestras

El tejido muscular de calamar fue adquirido en la central de abastos la Nueva Viga, empacado al vacío en bolsa de polietileno y almacenado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 8 meses. Las muestras se analizaron cada cuatro semanas para las pruebas de solubilidad, capacidad de retención de agua, pH y pérdida de peso.

### 5.2 Determinación de proteína

La determinación de proteína se llevó a cabo mediante el método de biuret (Gornall y col., 1949). El método se basa en la formación de un complejo colorido cobre-proteína en condiciones alcalinas. Los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patrón de albúmina bovina con una concentración máxima de 10 mg/mL, y se leyó a 540 nm. Para ver la preparación de los reactivos ver el Anexo I.

### 5.3 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar

Una vez obtenido el extracto enzimático crudo del manto del calamar gigante, se llevó a cabo la determinación del perfil de pesos moleculares mediante electroforesis.

**5.3.1 Electroforesis desnaturizante.** Las muestras del extracto enzimático crudo, se sometieron a la técnica de electroforesis desnaturizante utilizándose la técnica reportada por García y col. (1998). Se analizaron un volumen de  $15\mu\text{L}$  de la muestra y uno de  $10\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular. El análisis se llevó a cabo a corriente constante de 200 volts, utilizándose un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, CA.) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después del análisis, los geles se desmontaron

- Evaluar la degradación de la fracción miofibrilar de músculo congelado mediante sus perfiles electroforéticos.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Preparación de las muestras

El tejido muscular de calamar fue adquirido en la central de abastos la Nueva Viga, empacado al vacío en bolsa de polietileno y almacenado en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 8 meses. Las muestras se analizaron cada cuatro semanas para las pruebas de solubilidad, capacidad de retención de agua, pH y pérdida de peso.

### 5.2 Determinación de proteína

La determinación de proteína se llevó a cabo mediante el método de biuret (Gornall y col., 1949). El método se basa en la formación de un complejo colorido cobre-proteína en condiciones alcalinas. Los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patrón de albúmina bovina con una concentración máxima de 10 mg/mL, y se leyó a 540 nm. Para ver la preparación de los reactivos ver el Anexo I.

### 5.3 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar

Una vez obtenido el extracto enzimático crudo del manto del calamar gigante, se llevó a cabo la determinación del perfil de pesos moleculares mediante electroforesis.

**5.3.1 Electroforesis desnaturalizante.** Las muestras del extracto enzimático crudo, se sometieron a la técnica de electroforesis desnaturalizante utilizándose la técnica reportada por García y col. (1998). Se analizaron un volumen de  $15\mu\text{L}$  de la muestra y uno de  $10\mu\text{L}$  del marcador de peso molecular. El análisis se llevó a cabo a corriente constante de 200 volts, utilizándose un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab cell de Bio-Rad (Richmond, CA.) a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después del análisis, los geles se desmontaron

y se tiñeron en una disolución 0.1% de azul de Coomasie R-250 durante 30 a 40 min. Finalizado este tiempo, 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,). 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). La elaboración de los reactivos se describe en el Anexo II.

#### **5.4 Determinación de solubilidad de las proteínas presentes en el músculo de calamar**

**5.4.1 Extracción de actinomisina.** La fracción de la actomiosina o soluble en sal (SSP) fue extraída por el método reportado por Woyewoda y col., 1986, que consiste en una homogeneización con una disolución salina al 5%. Para consulta de la preparación de los reactivos ver Anexo III.

Para realizar la extracción se tomaron 5g de calamar congelado y se colocaron en un vaso de licuadora (enfriado en baño de hielo), junto con la disolución de extracción previamente enfriada. Se homogeneizó en licuadora por un minuto, evitando la formación de espuma. El homogeneizado se centrifugó en una centrífuga Beckman, modelo JM-1, (Palo Alto C.A) por 30min., 13000 rpm, 4°C.

**5.4.2 Extracción con SDS, SDSY UREA, Y SDS Y Mercaptoetanol.** El precipitado insoluble se extrajo con diferentes disoluciones detergentes (SDS, SDS y UREA, SDS y Mercaptoetanol) para romper interacciones secundarias y puentes disulfuro según el método reportado por Huidobro y col., 1997. Para consulta de la preparación de los reactivos ver el Anexo IV.

El precipitado se dividió en tres partes iguales, colocando cada una de éstas en un vaso de precipitados, y agregando posteriormente a cada uno las

disoluciones mencionadas, en una proporción de 1:4, con agitación de 10, 1440 y 1440 minutos respectivamente. En la Tabla 11 se observan los tiempos de agitación para las disoluciones detergentes utilizadas.

TABLA 11. TIEMPO DE AGITACIÓN PARA CADA DISOLUCIÓN DETERGENTES (SDS, SDS + UREA Y SDS +  $\beta$ -MERCAPTOETANOL) UTILIZADAS SEGÚN LO REPOSTADO POR HUIDOBRO Y COL., 1997

Soluciones detergentes	Tiempo
SDS 2%	10 minutos
SDS 2% + Urea 8M	1440 minutos
SDS 2% + $\beta$ -Mercaptoetanol 5%	1440 minutos

Pasado el tiempo, se procedió a centrifugar cada solución a 13000 rpm durante 30 minutos, y al sobrenadante se determinó el contenido de proteína por el método de biuret, y el perfil electroforético.

**5.4.3 Extracción de proteínas miofibrilares.** Se realizó por el método reportado por Alanís-García 1993, que consiste en extracciones sucesivas con disoluciones de baja y alta fuerza iónica, conteniendo EDTA y Pirofosfato de sodio.

Para realizar la extracción se tomaron porciones de calamar congelado y se homogeneizaron en proporciones 1:10 con disolución A de baja fuerza iónica. Se centrifugó con una centrífuga a 9000 rpm., 25min., a 4°C, descartando el sobrenadante "a" (fracción sarcoplasmática). Se resuspendió el precipitado "a" en una proporción 1:10 de la disolución A centrifugando con una centrífuga a 9000 rpm, 25min., 4°C, descartando el sobrenadante "b" (fracción sarcoplasmática). Se resuspendió el precipitado "b" en una proporción 1:6 de la solución B de alta fuerza iónica, y se agitó a baja velocidad a una temperatura de 4°C durante la noche. Después se centrifugó a 9000 rpm, 25min., a 4°C y se descartó el precipitado "c" (fracción del estroma). Se decantó con cuidado el sobrenadante "c" (fracción miofibrilar) y se diluyó hasta una fuerza iónica de 0.1 con agua desionizada enfriada a 4°C, dejando reposar toda la noche en refrigeración. Se eliminó por decantación el exceso

de agua y se centrifugó a 9000 rpm, 30min., a 4°C . Se resuspende el precipitado "d" en 2.5 ml de disolución C, de alta fuerza iónica, centrifugado a 9000 rpm, 15 min., a 4°C. Para consulta de la preparación de los reactivos ver el Anexo V. Al sobrenadante se le determinó el contenido de proteína por el método de biuret, y el perfil electroforético.

## 5.6 Determinación de formaldehído

Se siguió el método reportado por Woyewoda y col., 1986. En músculos congelados de algunas especies de pescados, el óxido de trimetilamina (OTMA) se degrada hasta dimetilamina (DMA) y formaldehído. El formaldehído libre en el extracto de ácido perclórico reacciona a 60°C con reactivo colorido de Nash que contiene acetilacetona con un exceso de acetato de amonio para producir diacetildihidrolutidina, midiéndose espectrofotométricamente a 415nm.

**5.6.1 Extracción.** Para realizar la extracción se tomaron 30g de calamar congelado, los cuales se homogeneizaron con el doble de volumen de la solución de ácido perclórico al 6%, durante dos minutos. Después de lo cual se dejó reposar la mezcla por 5 minutos. Se filtró el extracto a través de un filtro Whatman # 1. Se colectaron alícuotas de 25 ml.

**5.6.2 Neutralización.** Se estandarizó cuidadosamente el potenciómetro ( $\phi$ so pH Meter Beckman), usando soluciones buffer estándar comerciales pH 4 y 7 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA). Se neutralizaron las alícuotas de 25ml de los filtrados de ácido perclórico (J.T.Baker, México) a un pH de 7, mediante la cuidadosa adición con bureta de hidróxido de potasio al 30% (J.T.Baker, México). Cuidando de no exceder el pH de 7, y anotando el volumen de hidróxido empleado. Posteriormente se indujo una formación de un compuesto colorido con el reactivo de Nash, al cual se leyó la absorbencia a 440nm, interpolando el valor obtenido en la curva patrón de formaldehído. Para consulta de la preparación y análisis de los reactivos para la determinación del formaldehído ver el Anexo VI.

## **5.7 Determinación de CRA**

La capacidad de retención de agua (CRA), es un término empleado para describir la capacidad de una matriz de moléculas, normalmente macromoléculas, para atrapar grandes cantidades de agua de tal manera que evite la exudación. La determinación de capacidad de retención de agua se realizó por el método recomendado por Guerrero, 1995. La CRA se determinó picando una muestra de 10g de manto de calamar congelado y colocándola en tubos para centrifuga, añadiendo posteriormente 8ml de una solución 0.6M de NaCl (J.T.Baker, México), y agitándose la mezcla con una varilla de vidrio por un minuto. Se colocaron los tubos en un baño de hielo durante 30 minutos, después de lo cual se agitaron nuevamente por un minuto. Se centrifugaron los tubos con una centrifuga Beckman, modelo JM-1 (Palo Alto C.A), a 10000 rpm por 13 min., se decantó el sobrenadante en una probeta, y se midió el volumen no retenido de los 8ml de solución de NaCl. Reportándose la CRA como los ml de agua retenida por 100g de muestra. Para consulta de la preparación de los reactivos ver el Anexo VII.

## **5.8 Determinación de pH**

La determinación de pH se realizó por lo recomendado por Guerrero, 1995. Para determinar el pH, se tomaron 10 g de muestra de manto de calamar congelado, a los cuales se añadieron 100ml de agua destilada y se molieron en licuadora durante un minuto. Se estandarizó el pH en el potenciómetro con buffer de fosfatos pH 7 y 4 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA). Se filtró la mezcla de carne en manta de cielo para eliminar tejido conectivo, y se procedió a determinar el pH del filtrado. Para consulta de preparación de reactivos ver Anexo VIII.

## **5.9 Determinación de pérdida de peso por deshielo**

Según el método reportado por Huidobro y colaboradores, 1997. Esta determinación fue obtenida por diferencia de peso de una muestra de 10g de manto de calamar congelado empacada al vacío, y el peso del manto descongelado a temperatura ambiente. Reportándose el resultado en porcentaje de pérdida de peso.

## **5.10 Determinación de pérdida de peso por cocción**

Según el método reportado por Huidobro y colaboradores, 1997. Para lo cual las muestras de manto de calamar congeladas y empacadas al vacío en bolsas de polietileno fueron introducidas en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos. Reportando la pérdida de peso entre la muestra antes de congelar y después de cocción.

## **5.11 Determinación de la actividad proteolítica del extracto crudo del manto del calamar.**

La determinación de la actividad proteolítica se llevó a cabo por medio de los métodos de Kunitz, 1947, utilizándolo como sustrato la caseína al 1% (en una disolución amortiguadora de fosfatos 20mM, pH 7, NaCl 0.9%) y el de Anson reportado por Ouali y Valin, 1980, utilizando hemoglobina al 1% (en una disolución amortiguadora universal 25mM). Para la preparación de hemoglobina y caseína. El sustrato se incubó a la temperatura de prueba durante 10min en un baño de temperatura controlada; una vez adicionado el extracto enzimático, se incubó por diez minutos para que se pudiera llevar a cabo la hidrólisis, la cual se detuvo con la adición de una disolución de Tricloroacético (TCA) al 50%, se enfrió por 10 min a 4°C y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 11000g a 4 °C, con el fin de remover la proteína insoluble en ácido. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280nm 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 D.O. a una longitud de onda de 280nm por minuto bajo las condiciones establecidas por Yamaguchi y col., 1982.

### **5.11.1 Obtención del extracto enzimático crudo del manto del calamar.**

Se tomó una porción del calamar congelado, se hicieron cortes finos de aproximadamente 3mm, y posteriormente se homogeneizaron con un amortiguador de fosfatos (20mM, pH de 7 y 0.9% de NaCl), en una proporción 1:1 (p/v). Posteriormente el extracto se sometió a centrifugación a 11,000g durante 20 min a 4°C en frascos de 250mL. El sobrenadante obtenido fue considerado como el extracto crudo del manto del calamar y se le determinó el perfil electroforético.

**5.11.2 Condiciones de temperatura y pH.** Para determinar la actividad proteolítica, se utilizó una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  y pH de 2.7, 3.1, 6.1, 7.3 y 7.6 reportados en el trabajo por Dublin, 2001. Para cada uno de estos se utilizó un sustrato adecuado; es decir, para pH ácidos se utilizó hemoglobina al 1%, y para pH alcalinos se utilizó caseína al 1%.

## 5.12 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza y comparación múltiples de Duncan para determinar los siguientes aspectos:

Análisis de varianza para solubilidad de proteínas miofibrilares  
temperatura de congelación

Análisis de varianza para solubilidad de proteínas miofibrilares

Análisis de varianza para solubilidad en SDS 2% +  $\beta$ -mercaptoetanol 5%

Análisis de varianza para la capacidad de retención de agua

Análisis de varianza para pH.

Análisis de varianza para pérdida de peso por deshielo respecto al tiempo y temperatura de congelación

Análisis de varianza para pérdida de peso por cocción respecto al tiempo y temperatura.

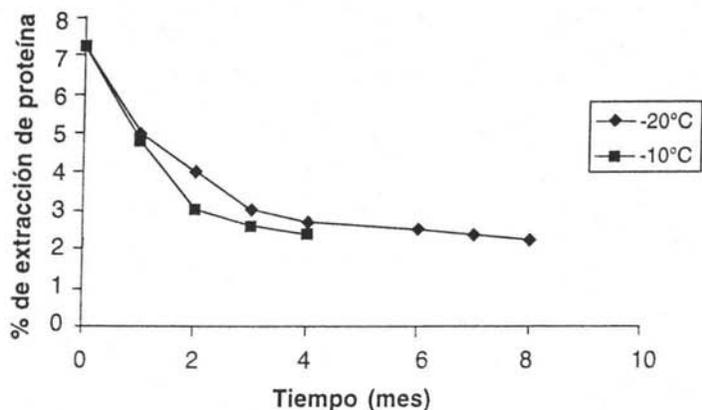
Análisis de varianza para determinación de actividad proteolítica.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Solubilidad

**6.1.1 Proteína soluble en sal.** Las pruebas más populares utilizadas para estudiar los cambios durante el almacenamiento en congelación son las

relacionadas a la pérdida de solubilidad o pérdida de extractibilidad en la proteína total de los productos marinos, o de un grupo particular de proteínas como las proteínas miofibrilares. En la Gráfica 1 se observa que la solubilidad de las proteínas va disminuyendo gradualmente con el tiempo de almacenamiento en congelación.



Gráfica 1. Porcentaje de extracción de proteína soluble en disolución salina respecto al tiempo y temperatura de congelación

El decremento en la solubilidad es mayor a una temperatura de congelación de  $-10^{\circ}\text{C}$  con relación a la de  $-20^{\circ}\text{C}$ . La desnaturalización de las proteínas se debe a los cambios en la actividad acuosa durante el almacenamiento en congelación. Ya que en primer lugar se congela el agua de aquellas zonas, cuyas sustancias (soluto) están más diluidas. Con lo cual se eleva la concentración en soluto del agua que aún no llegó a congelarse.

La concentración de sales puede alcanzar un grado tal que propicie la puesta en marcha de una desnaturalización de las proteínas en los sectores contiguos, lo que se traduce en una escasa solubilidad en las disoluciones salinas de la carne congelada. Dado que a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  la cantidad de agua que no se llega a congelar es mayor, se explica el por qué tiene mayores efectos en la desnaturalización de las proteínas. Otra causa es el probable aumento en la actividad de la OTMAasa, que trae como consecuencia la formación de formaldehído, el cual reacciona con las proteínas

para formar enlaces de tipo covalente, y dar así lugar a compuestos insolubles llamados agregados. Otro efecto dañino durante la congelación es la formación de cristales de hielo ínter e intracelular, los cuales llevan a las fracturas en las células, rupturas de las membranas, y el desordenamiento de la ultraestructura de las células y tejidos. Dado que a  $-10^{\circ}\text{C}$  hay menor número de cristales porque la velocidad de congelación es más lenta, son más grandes por lo que el daño físico es más grande y por lo tanto la desnaturalización de proteínas es mayor que a  $-20^{\circ}\text{C}$ , donde los cristales son mayores en número pero más finos.

TABLA 12. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SAL RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	0.9769	0.08141	2116.71	0.0001
Error	26	0.0010	0.000038		
Total	38	0.9779			

$R^2=0.998977$

TABLA 13. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SAL RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

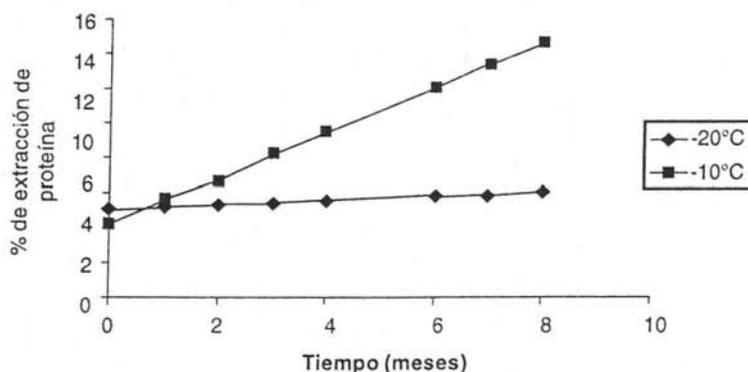
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Temperatura	1	0.2943	0.2943	7654.08	0.0001
Tiempo	7	0.4061	0.0580	1508.72	0.0001
Temp.*tiempo	4	0.2763	0.0690	1796.35	0.0001

De acuerdo al análisis de varianza en las Tablas 12 y 13 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de proteína soluble en sal, cuando se almacena el manto de calamar a  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , ya que el valor de Pr>F calculado es menor a 1. Al realizar el análisis de varianza donde interactúan

el tiempo y la temperatura de congelación, vemos que existe una interacción significativa entre estos dos parámetros ( $Pr > F$  calculado es menor a 1). Además de que son significativos los efectos, en la solubilidad.

### 6.1.2 Solubilidad en soluciones detergentes.

A. *Solubilidad en SDS al 2%*. En la Gráfica 2 se observa como aumenta la concentración de proteína soluble en SDS 2%, durante el tiempo de almacenamiento, este aumento fue mayor a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Lo que indica la formación de interacciones secundarias (enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las fuerzas de Van der Waals), entre los grupos químicos reactivos de las proteínas, como las cadenas laterales de ácidos ionizados, y otros componentes del músculo como los iones inorgánicos (Na, K, Ca, Mg, etc)



Gráfica 2. Variación del % de proteína soluble en SDS 2% respecto al tiempo y temperatura de congelación

TABLA 14. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SDS RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

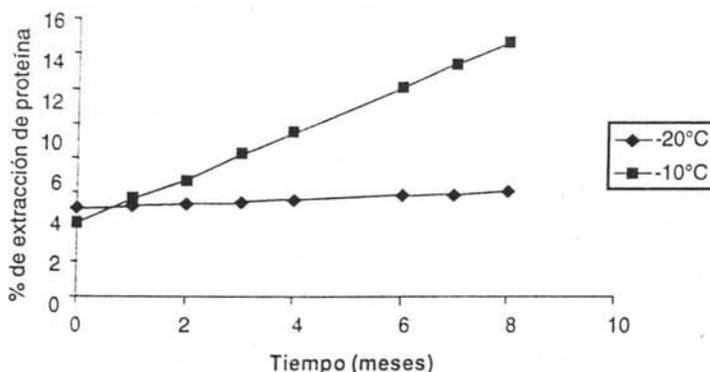
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	409.5569	34.129	154.95	0.0001
Error	26	5.7266	0.2202		
Total	38	415.28			

$R^2 = 0.9862$

TABLA 15. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SDS RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Temperatura	1	0.2943	0.2943	7654.08	0.0001
Tiempo	7	0.4061	0.0580	1508.72	0.0001
Temp*tiempo	4	0.2763	0.0690	1796.35	1.0000

En el análisis de varianza Tablas 14 y 15 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de proteína soluble en SDS ( $Pr>F$  calculado es menor a 1), cuando se almacena el manto de calamar a  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , y aumenta la fracción insoluble. Al realizar el análisis de varianza donde interactúan el tiempo y la temperatura de congelación, vemos que tienen efecto significativo ( $Pr>F$  calculado es menor a 1), pero no así el tiempo y la temperatura por sí mismos, ya que éstos sí tienen un efecto significativo ( $Pr>F$  calculado es igual a 1).



Gráfica 3. Variación del % de proteína soluble en SDS 2% y urea 8M respecto al tiempo y temperatura de congelación

*B. Solubilidad en SDS 2% + urea 8M respecto al tiempo y temperatura de congelación.* En la Gráfica 3 de solubilidad en SDS 2% y urea 8M, se ve que durante el tiempo de almacenamiento en congelación se forman los enlaces secundarios (enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las fuerzas de Van

der Waals), entre los grupos químicos reactivos de las proteínas, sólo que en este caso la unión es más fuerte, ya que para solubilizarlo se emplean dos tipos de detergentes. La tendencia de la Gráfica 3, indica que a  $-10^{\circ}\text{C}$ , tendería a formarse con el tiempo, mayor cantidad de enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las fuerzas de Van der Waals.

TABLA 16. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SDS Y UREA RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN. (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	319.55	26.63	46.12	0.0001
Error	26	15.012	0.577		
Total	38	334.56			

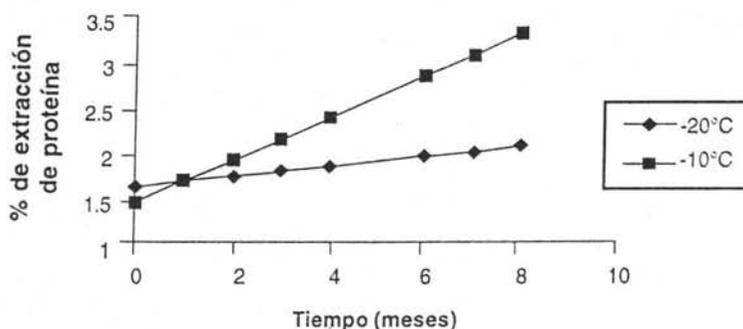
$R^2= 0.9551$

TABLA 17. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SDS Y UREA RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN. (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Temperatura	1	16.346	16.346	28.31	0.0001
Tiempo	7	194.221	27.745	48.05	0.0001
Temp*tiempo	4	108.9886	27.247	47.19	0.0001

En el análisis de varianza Tablas 16 y 17 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de proteína soluble en SDS y urea ( $Pr>F$  calculado es menor a 1), cuando aumenta la fracción insoluble. Al realizar el análisis de varianza donde interactúan el tiempo y la temperatura de congelación, se ve que efectivamente existe una interacción significativa entre estos dos parámetros ( $Pr>F$  calculado es menor a 1).

C. Solubilidad en 2% SDS y Mercaptoetanol al 5% (interacciones secundarias y puentes disulfuro). Con los datos arrojados de la Gráfica 4 se puede suponer que además de los enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las fuerzas de Van der Waals pudieran existir interacciones de los puentes disulfuro. Al igual que los resultados obtenidos con los detergentes de SDS 2% y UREA 8M la tendencia a formar enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos y las fuerzas de Van der Waals es mayor a una temperatura de congelación de  $-10^{\circ}\text{C}$  que de  $-20^{\circ}\text{C}$ , esto nos indicaría que conforme avanza el tiempo de almacenamiento la degradación de proteínas aumenta, y como consecuencia la aparición de enlaces o puentes disulfuro.



Gráfica 4. Variación del % de proteína soluble en SDS 2% y mercaptoetanol 5% respecto al tiempo y temperatura de congelación

TABLA 18. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SDS Y  $\beta$ -MERCAPTOETANOL RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN. (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	9.9302	0.8275	98.94	0.0001
Error	26	0.2174	0.0083		
Total	38	10.1476			

$R^2=0.9785$

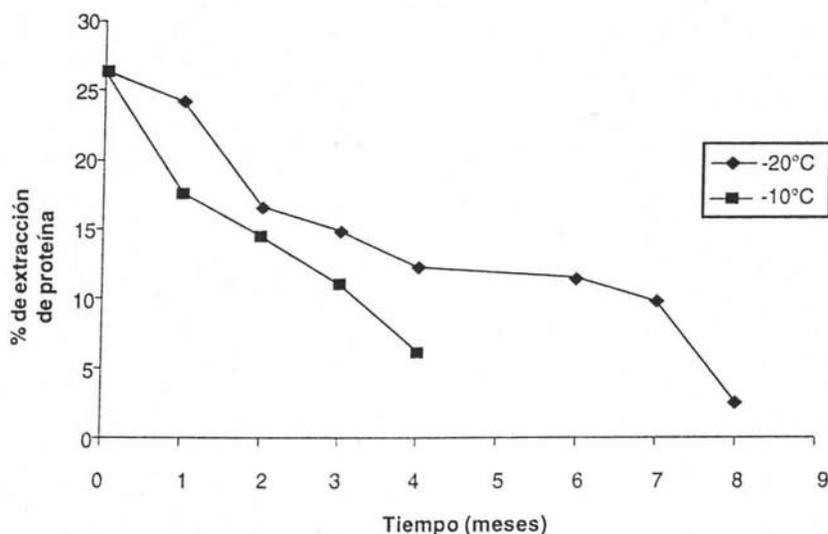
TABLA 19. VARIACIÓN DE PROTEÍNA SOLUBLE EN SDS Y  $\beta$  MERCAPTOETANOL RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Temperatura	1	0.1530	0.1530	18.29	0.0002
Tiempo	7	7.1934	1.0276	122.86	0.0001
Temp*tiempo	4	2.5837	0.6459	77.23	0.0001

En el análisis de varianza Tablas 18 y 19 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de proteína soluble en SDS y mercaptoetanol ( $Pr>F$  calculado es menor a 1). Lo mismo se concluye con el análisis de varianza donde interactúan el tiempo y la temperatura de congelación, que existe una interacción significativa entre estos dos parámetros ( $Pr>F$  calculado es menor a 1).

**6.1.3 Solubilidad de proteínas miofibrilares.** Al igual que la solubilidad de proteínas en sales detergentes (SDS, UREA y Mercaptoetanol) en la Gráfica 5 se observa que hay disminución en la extractibilidad de proteínas miofibrilares a una temperatura de congelación de  $-10^{\circ}\text{C}$  por lo que la desnaturalización de proteínas miofibrilares es mayor a  $-10^{\circ}\text{C}$  que a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Esta desnaturalización de proteínas miofibrilares se da principalmente porque al aumentar la concentración de sales durante la congelación se esperarían que las moléculas de miosina (la proteína más abundante en las unidades contractiles) a una alta fuerza iónica, durante periodos largos, se disocian en sus subunidades: cadenas pesadas y componentes ligeros, los cuales sufren agregación en la presencia de sales. Las cadenas pesadas sufren cambios en su conformación y forman agregados insolubles.

Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo del calamar



Gráfica 5. Variación del porcentaje de solubilidad de proteínas miofibrilares respecto al tiempo y temperatura de congelación

La actina, que se encuentra asociada además a troponina, actinina y tropomiosina, y que es la segunda proteína más abundante, podría sufrir ciertos cambios durante la congelación. El proceso de polimerización es acompañado además, de la asociación de la actina con lípidos neutros y polares, formando complejos lipoproteicos insolubles.

TABLA 20. VARIACIÓN DEL PORCENTAJE DE SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN. (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	1943.43	161.953	253.46	0.0001
Error	26	16.6133	0.6389		
Total	38	1960.049			

R<sup>2</sup>= 0.9915

**TABLA 21. VARIACIÓN DEL PORCENTAJE DE SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)**

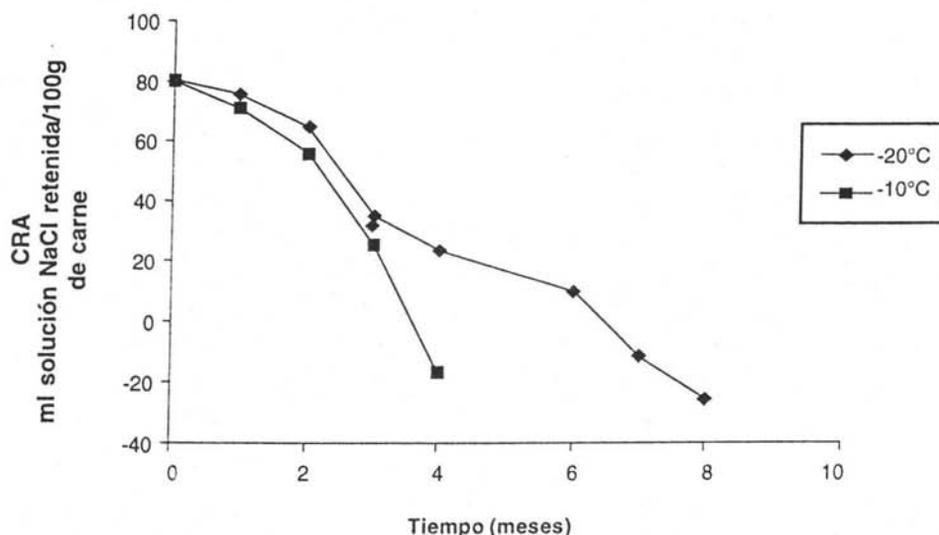
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
<b>Temperatura</b>	1	1.0723	1.0723	1.68	02066
<b>Tiempo</b>	7	1792.725	256.10	400.80	0.0001
<b>Temp*tiempo</b>	4	140.637	637.409	58.55	0.0001

En el análisis de varianza Tablas 20 y 21 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de la extracción de proteínas miofibrilares ( $Pr>F$  calculado es menor a 1). Con el análisis de varianza donde interactúan el tiempo y la temperatura de congelación, notamos que existe una interacción significativa entre estos dos parámetros ( $Pr>F$  calculado es menor a 1). Lo mismo sucede con el tiempo donde también existe una diferencia significativa ( $Pr>F$  calculado es menor a 1). Pero cuando se toma a la temperatura, se ve que tienen un efecto significativo ( $Pr>F$  calculado es mayor a 1), por lo que este parámetro no influye en la solubilidad de proteínas miofibrilares.

## 6.2 Capacidad de retención de agua (CRA)

De acuerdo a los resultados de la Gráfica 6, se observa que la CRA de las proteínas miofibrilares va disminuyendo de acuerdo al tiempo de almacenamiento en congelación. Sólo que a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  el tiempo en el cual se pierde la CRA es de cuatro meses en comparación de la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  que se observa este fenómeno hasta el mes ocho.

Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo del calamar



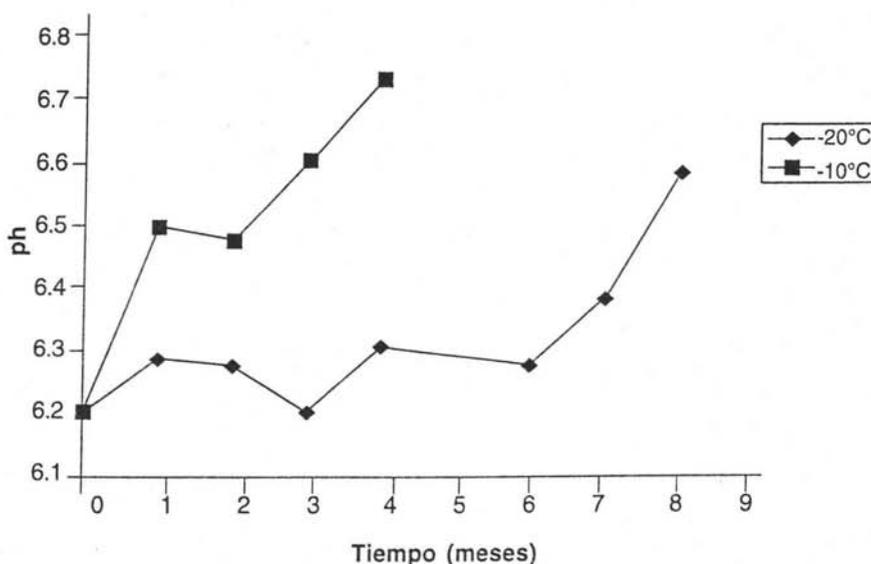
Gráfica 6. Capacidad de retención de agua respecto al tiempo y temperatura de congelación

TABLA 22. VARIACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (CRA) RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN ESTADÍSTICO POR MEDIO DE ANOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	52970.1421	8428.6990	1365.87	0.0001
Error	26	160.444333	6.170936		
Total	38	53130.586497			

R<sup>2</sup>= 0.996980

Con el análisis de varianza Tabla 22 observamos que sí hay diferencia significativa entre los valores de la CRA. Existe diferencia significativa con el tiempo y la temperatura (Pr>F calculado es menor a 1).



Gráfica 7. Variación del pH respecto al tiempo y temperatura de congelación

### 6.3 Variación del pH con respecto al tiempo de almacenamiento

Como se puede observar en la Gráfica 7 el pH del músculo de calamar congelado tanto a  $-10^{\circ}\text{C}$  como a  $-20^{\circ}\text{C}$  tiende a aumentar, sólo que este aumento es más rápido a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

La desnaturalización de proteínas miofibrilares, debida a varios factores ya vistos, tiene ciertos efectos sobre las propiedades de éstas. Tal es el caso de la pérdida de retención de agua, el cual es más evidente a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  debido a que los daños son mayores, ya que hay mayor acumulación de formaldehído, concentración de sales, formación de cristales de mayor longitud, entre otros, que en conjunto favorecen una mayor desnaturalización de proteínas miofibrilares, responsables de brindarle al músculo varias características como textura, capacidad de gelificación, y en especial la capacidad de retención de agua.

La probable presencia de otros compuestos con grupos amino presentes, como los nucleótidos, pudieran haber ocasionado el aumento en el pH.

Otra causa pudiera ser la degradación de las proteínas, que como consecuencia de su desnaturalización por efecto de la baja actividad de agua y la formación de cristales de hielo, libera grupo terminales amino o la liberación de compuestos nitrogenados como dimetilamina y otros compuestos provenientes de la actividad proteolítica.

Como se observa en la Gráfica 7 tales efectos se presentan más rápidamente a un tiempo de almacenamiento menor y en mayor proporción a una temperatura de congelación de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

TABLA 23. VARIACIÓN DEL PH AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN. (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Modelo	12	0.9769	0.4090	10635.22	0.0001
Error	26	0.0010	0.0001		
Total	38	0.9779			

$R^2=0.998977$

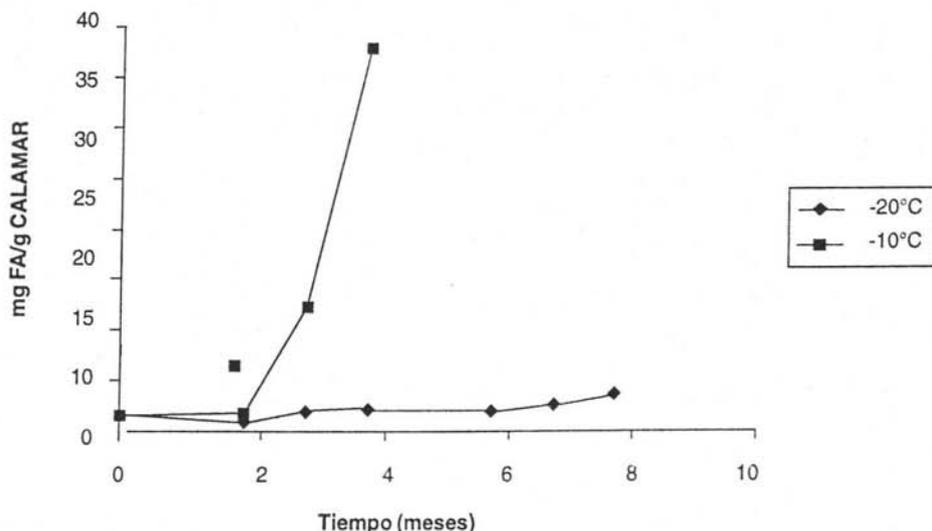
Con el análisis de varianza Tabla 23 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de pH obtenidos durante el almacenamiento de manto de calamar en congelación. Además existe diferencia significativa con el tiempo y la temperatura ( $Pr>F$  calculado es menor a 1).

#### 6.4 Concentración de formaldehído

En la Gráfica 8 se puede observar que la concentración de formaldehído aumenta al transcurrir el tiempo de almacenamiento, sólo que a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  esta concentración al tercer mes aumenta alcanzando un máximo al cuarto (300mg de FA/100g de calamar), en comparación con la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  en la cual no se llega a esos niveles de concentración (máximo de 5mg de FA/100g Calamar), aún en los meses siete y ocho.

El Pescado blanco se considera generalmente fresco si el nitrógeno volátil total NVT es menor de 20 mg N/100 g. Si el valor de NVT alcanza 30 mg N/

100g la mayor parte de las autoridades consideran que el pescado es viejo, y un nivel de 40mg N/100g indica que el pescado es impropio para el consumo. En el caso de los pescados grasos, la rancidez de la grasa se considera como un indicador



Gráfica 8. Variación de la formación de formaldehído respecto al tiempo y temperatura de congelación

La presencia de formaldehído es indicativa de la degradación, del óxido de trimetilamina presente naturalmente en varios productos marinos, entre ellos el calamar. Su presencia señala la probable formación de agregados entre este compuesto y las proteínas presentes en el manto. Esto indica que a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  la actividad de la enzima OTMAasa (óxido de trimetilaminasa) es mayor que a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por lo tanto puede transformar en mayor proporción al OTMA (óxido de trimetilamina).

**TABLA 24. VARIACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FORMALDEHÍDO RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
<b>Modelo</b>	12	3711.3010	309.275	960.33	0.0001
<b>Error</b>	26	8.3733	0.32205		
<b>Total</b>	38	3719.674			

R<sup>2</sup>= 0.997749

**TABLA 25. ANOVA PARA LA FORMACIÓN DE FORMALDEHÍDO RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN**

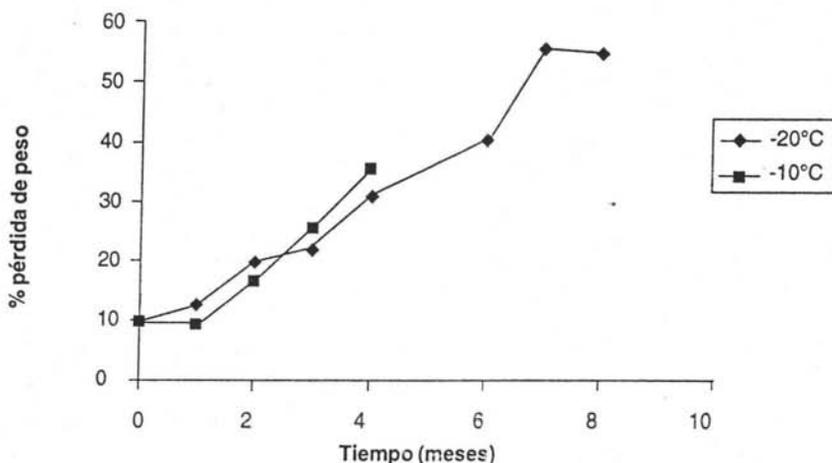
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
<b>Temperatura</b>	1	739.4077	739.4077	2295.93	0.0001
<b>Tiempo</b>	7	1652.6110	236.0872	733.07	0.0001
<b>Temp*tiempo</b>	4	1319.2823	329.8205	1024.12	0.0001

Con el análisis de varianza Tablas 24 y 25 se observa que sí hay diferencia significativa entre los valores de formación de formaldehído (Pr>F calculado es menor a 1). El tiempo y la temperatura de congelación tienen un efecto significativo en la acumulación de formaldehído (Pr>F calculado es menor a 1). Lo mismo sucede con los parámetros individuales.

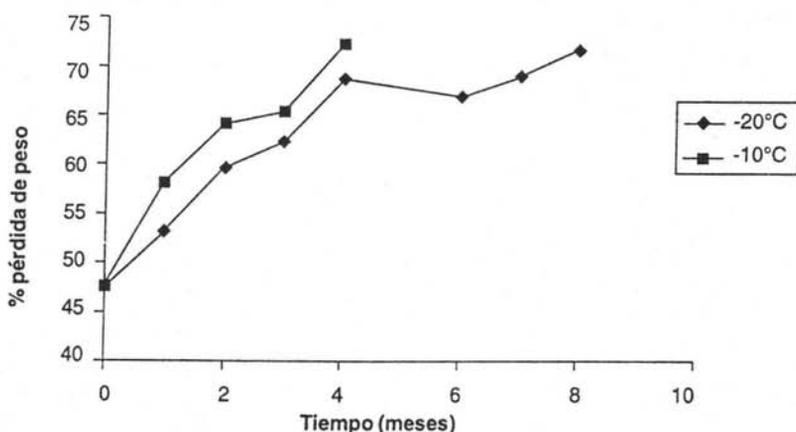
### 6.5 Pérdida de peso por deshielo y por cocción

En las Gráficas 9 y 10, se observa aumento paulatino en la pérdida de peso en el músculo de calamar después de deshielo y de cocción es mayor a -10°C, tal como se ha venido observando en los anteriores resultados. Todo esto como consecuencia de la alteración histológica por los cristales de hielo formados durante el tiempo de almacenamiento, alteraciones en las uniones de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas de ácidos grasos libres, con-

centración de sales y competición por agua de hidratación, y la posterior desnaturalización de proteínas miofibrilares, cuyos grupos funcionales reaccionan con los productos resultantes de la oxidación de lípidos, los radicales metilos del OTMA (formaldehído), y por intercambio de radicales disulfuro, y que finaliza con proteínas desnaturalizadas y agregadas, las cuales pierden sus propiedades y por lo tanto se ve reflejado en pérdida de peso por deshielo o por proceso térmico.



Gráfica 9. Variación del porcentaje de pérdida de peso por deshielo respecto al tiempo y temperatura de congelación



Gráfica 10. Variación del porcentaje de pérdida de peso por cocción al tiempo y temperatura de congelación

**TABLA 26. VARIACIÓN DE LA PÉRDIDA DE PESO POR DESHIELO RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA)**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
<b>Modelo</b>	12	9404.7164	783.7263	83.11	0.0001
<b>Error</b>	26	245.17333	9.42974		
<b>Total</b>	38	9649.8897			

R<sup>2</sup>= 0.974593

**TABLA 27. ANOVA PARA PÉRDIDA DE PESO POR DESHIELO RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
<b>Temperatura</b>	1	1198.0528	1198.0528	127.05	0.0001
<b>Tiempo</b>	7	9324.2664	1332.0380	141.26	0.0001
<b>Temp*tiempo</b>	4	0.0000000	0.0000000	0.00	1.0000

Con el análisis de varianza Tablas 26 y 27, se observa que hay diferencia significativa entre los valores de pérdida de peso por deshielo durante el almacenamiento a las temperaturas de -10°C y -20°C.

**TABLA 28. VARIACIÓN DE LA PÉRDIDA DE PESO POR COCCIÓN RESPECTO AL TIEMPO Y TEMPERATURA DE COCCIÓN (ESTADÍSTICA POR MEDIO DE ANOVA).**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
<b>Modelo</b>	12	2535.1497	211.2624	18.81	0.0001
<b>Error</b>	26	291.95333	11.22897		
<b>Total</b>	38	2827.1030			

R<sup>2</sup>= 0.896731

**TABLA 29. ANOVA PARA PÉRDIDA DE PESO POR COCCIÓN RESPECTO A LA INTERACCIÓN DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE CONGELACIÓN**

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrada	F	Pr>F
Temperatura	1	7.21616	7.21616	0.64	0.4300
Tiempo	7	2435.88	347.983	30.99	0.0001
Temp*tiempo	4	92.0505	23.0126	2.05	0.1167

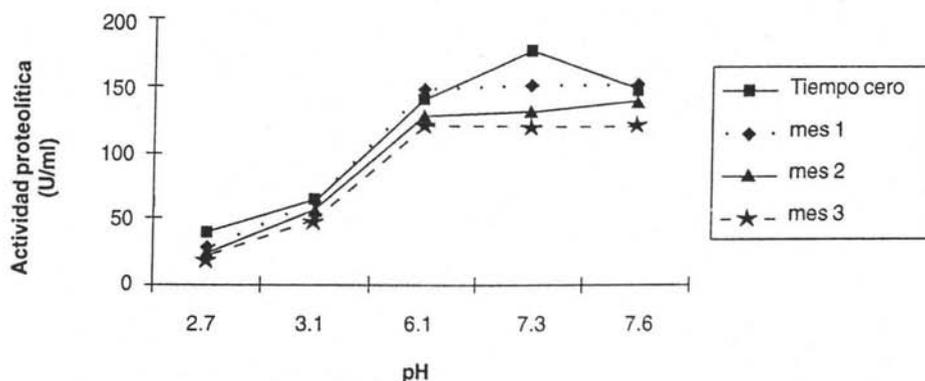
Con el análisis de varianza Tablas 28 y 29 se observa que hay diferencia significativa entre los valores de pérdida de peso por cocción obtenidos durante el almacenamiento de manto de calamar en congelación. Con el análisis de varianza donde interactúan el tiempo y la temperatura de congelación, se ve que no existe una interacción significativa entre la interacción de estos dos parámetros, y lo mismo se observa con la temperatura de congelación. Y sólo con el tiempo se observa una diferencia significativa.

### 6.6 Efecto del almacenamiento sobre la actividad proteolítica

En la Gráfica 11 se observa que al transcurrir el tiempo de almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  la actividad proteolítica tiene un máximo a un pH de 7.3 (proteasas neutras) y una mínima actividad a un pH de 3.1 (proteasas ácidas). Coincidiendo con lo que reporta Dublan 2001 y Rodger y col., 1984. Quienes observaron un máximo de actividad a pH de 7.3 y a pH de 3.1, lo cual podría indicarnos que los resultados obtenidos son semejantes. Como lo indica Zeece y Katoh, 1989, el pH óptimo para la actividad de catepsina D es alrededor de 3 a 4.5, mientras que otras catepsinas tienen sus máximas actividades a intervalos más ácidos (Ashie y col., 1996). Asimismo, Hurtado y col., 1999, reportaron una elevada actividad proteolítica en un intervalo de pH de 2 a 4.5, con lo cual puede decirse que el extracto enzimático crudo de calamar gigante podría tener este tipo de enzimas.

La actividad de algunas enzimas puede ser afectada por el incremento del pH, por ejemplo algunas isoenzimas de catepsinas D tienen su punto

isoeléctrico (pI) en un intervalo de 5.7 a 6.9 (Zeece y Kato, 1989). Makinodan y col. 1982, reportaron que catepsinas A y D aisladas del músculo de la carpa no tuvieron actividad a pH de 6 ó mayores.



Gráfica 11. Efecto del almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  sobre la actividad proteolítica endógena del manto de calamar

A los pH neutros, 6.1, 7.3 y 7.6, el incremento de la actividad proteolítica en el extracto del manto del calamar pudo ser debido a un incremento de las actividades de otras proteasas con actividad óptima o cercana a este intervalo de pH, por ejemplo una sulfhidril proteasa extraída del lenguado amarillo (*Limanda aspera*) ha mostrado tener una actividad óptima a pH de 6.5 (Wasson y col., 1992). Las proteasas neutras y proteasas activadas por  $\text{Ca}^{2+}$  aisladas de carpa (*Cyprinus carpio*) y de brema (*Pagrus major*) también tuvieron una actividad óptima a pH 7.0 (Wasson y col., 1992).

Al relacionar la temperatura de congelación con los datos anteriores podemos suponer que la congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) no inhibe a la mayoría de las enzimas y por lo tanto podríamos esperar que las enzimas que se encuentran activas puedan alterar las propiedades del músculo de calamar durante el deshielo.

**6.6.1 Determinación del perfil de pesos moleculares de las proteasas presentes en el extracto crudo del manto del calamar.** Para llevar a cabo la determinación del perfil de pesos moleculares, se realizaron diferentes ensayos para obtener la mejor resolución, llegando a una proporción en los geles de acrilamida de  $T=10\%$ .

Se obtuvo el peso molecular de las proteínas presentes en el extracto crudo del manto del calamar, utilizándose como referencia el patrón del carril V, teniéndose un intervalo de pesos moleculares de 11,000 a 395,000 Da. En la Tabla 30 se reportan los pesos moleculares obtenidos para cada una de las bandas.

TABLA 30. PESOS MOLECULARES CALCULADOS DEL EXTRACTO CRUDO DEL MANTO DEL CALAMAR GIGANTE

Proteínas	Da	Proteínas	Da
1	395.192	11	36.771
2	364.946	12	31.472
3	265.409	13	29.116
4	203.542	14	27.147
5	158.181	15	24.173
6	146.068	16	19.282
7	110.548	17	17.666
8	73.265	18	16.109
9	59.139	19	11.666
10	45.443		

De acuerdo a los pesos moleculares obtenidos, podemos observar que son similares a los pesos moleculares de algunas proteasas, tales como calpains de 17,000 a 30,000 Da, cathepsina H, 28,000 Da, calpaina L, 24,000 Da, entre otras.

En la Figura 6, muestra el perfil de pesos moleculares del extracto crudo enzimático del manto de calamar.

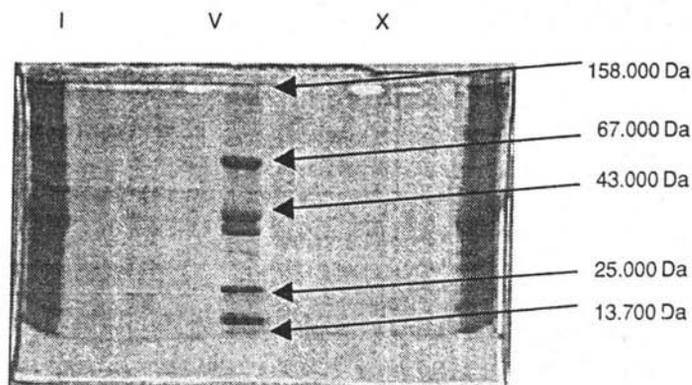


Figura 6. PAGE-SDS de las fracciones obtenidas del extracto enzimático del manto del calamar gigante obtenidas I y X: Extracto enzimático. V: Estándares de peso molecular conocido

De acuerdo al peso molecular que se encontró en el extracto crudo de calamar y los diferentes pH de actividad, se puede suponer que en el extracto crudo del manto del calamar gigante podría contener un conjunto de proteasas, tales como serin-proteasas, metalo-proteasas, cisteín-proteasas y asparto-proteasas, como lo reporta Dublan, 2001. De lo antes mencionado podemos suponer que las proteasas más activas a la temperatura de congelación de  $-20^{\circ}\text{C}$  podrían ser las enzimas neutras, calpains ya que el pH óptimo de actividad está en un intervalo de 6 a 8.5 (Carballo y López, 1991; Beyod y Bond, 1994), y las menos activas serían las enzimas ácidas como por ejemplo las catepsinas, ya que éstas tienen un pH óptimo de actividad en un intervalo de 3 a 5. (Carballo y López, 1991; Beyod y Bond, 1994).

**6.6.2 Perfil electroforético de proteínas miofibrilares del extracto del músculo de calamar gigante.** El análisis electroforético se llevo a cabo con la finalidad de observar la degradación de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se considero sólo esta temperatura para esta determinación ya que en la literatura y en la práctica se marca que a  $-20^{\circ}\text{C}$  es la temperatura de almacenamiento comercial. (Dublan, 2003).

Durante el almacenamiento en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , las proteínas miofibrilares se mantienen prácticamente íntegras durante este periodo de almacenamiento, sin embargo, a partir del segundo mes se observa el inicio de la degradación de las proteínas miofibrilares observándose la aparición de nuevas bandas de bajos pesos moleculares, esto puede ser debido a que al inicio del periodo de almacenamiento las enzimas proteolíticas presentes en el músculo empiezan a actuar, aunque a partir del tercer mes el proceso de desnaturalización no sólo se podría estar dando por hidrólisis enzimática, sino también por las reacciones durante la congelación, como por ejemplo, disociación y agregación de proteínas debido a la formación de formaldehído; fenómenos que podrían darse simultáneamente.

En la Figura 7, se muestra el perfil electroforético de las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 4 meses y una t del 10% respectivamente. El carril I es el marcador de pesos moleculares y el carril II es el tiempo cero.

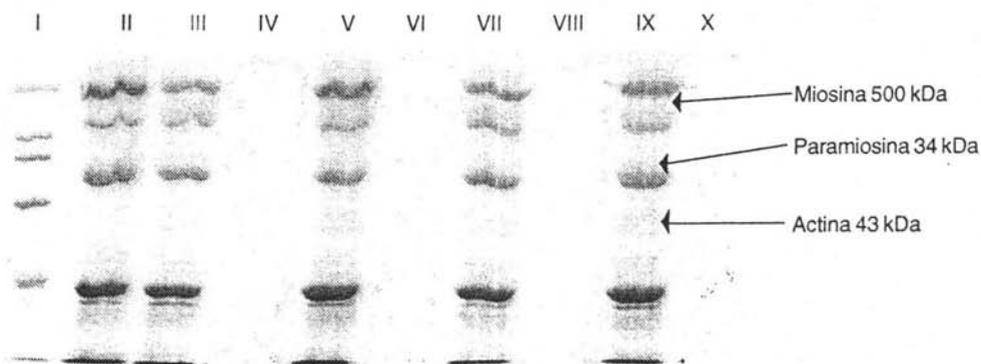


Figura 7. Perfil electroforético de las proteínas miofibrilares extraídas del manto del calamar almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 4 meses y una t del 10% respectivamente

Con los resultados discutidos anteriormente (determinación de formaldehído, actividad proteolítica, etc.) podríamos decir que a temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  ocurriría el mismo fenómeno a temperatura de refrigeración, sólo que a  $-10^{\circ}\text{C}$ , el proceso de degradación de las proteínas es más lento. Dublan, 2001 observó que a  $4^{\circ}\text{C}$  hay una fuerte degradación de las proteínas teniéndose por ejem-

pló la desaparición de la miosina, principal proteína del músculo de calamar gigante.

Con esto se podría decir que tanto a  $-10^{\circ}\text{C}$  como a  $4^{\circ}\text{C}$ , los fenómenos de degradación durante el almacenamiento, son similares no siendo así para la temperatura de almacenamiento de  $-20^{\circ}\text{C}$ , ya que los efectos de degradación de las proteínas, son más lentas y menos marcadas, como se discutió arriba.

El conocimiento de la tecnología de almacenamiento en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  da un indicio de la correcta manipulación no sólo de los productos marinos sino de los productos cárnicos en general. Con los resultados obtenidos durante este trabajo, se pueden proponer estas técnicas como un método para alargar la vida de anaquel de los productos marinos.

## CONCLUSIONES

- Se observó que a  $-20^{\circ}\text{C}$  es la mejor temperatura de almacenamiento.
- La solubilidad disminuye en ambas temperaturas ( $-10$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ ), debido a la formación de agregados en ambas temperaturas
- La capacidad de retención de agua disminuyó en ambas temperaturas durante el tiempo de almacenamiento teniendo un máximo al cuarto mes a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- La liberación o acumulación de formaldehído fue mayor a  $-10^{\circ}\text{C}$ , 300mg de FA/100g Calamar y a  $-20^{\circ}\text{C}$  fue de 5mg de FA/100g Calamar, por lo cual a  $-10^{\circ}\text{C}$  ya no se considera apto para consumo.
- Se considera que el calamar almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  apto para consumo y que el valor del formaldehído está por debajo de los 5mg de FA/100g Calamar.
- La pérdida de peso se observa en ambos tratamientos ( $-10^{\circ}\text{C}$  y a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) durante cocción y deshielo.
- Se obtuvo un máximo de actividad enzimática a un pH de 7.3 para enzimas neutras y uno de 3.1 para enzimas ácidas.
- El peso molecular observado en el extracto enzimático fue de un intervalo de 11,000 a 395,000 Da.
- Las proteasas presentes en el extracto enzimático de acuerdo a los resultados obtenidos (perfil electroforético, pH óptimo de actividad y temperatura). Se podrían tratar de serin-proteasas, metalo-proteasas, ciste-inproteasas, asparto-proteasas, catepsinas y calpaninas.
- Se observó degradación de proteína miofibrilar durante el almacenamiento, siendo la miosina, la paramiosina y la actina las más afectadas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Alanís G. E. *Acción de las proteasas de Pseudomona spp, sobre proteínas contráctiles de un sistema modelo*, Tesis de maestría, UAM Iztapalapa, México, D.F.
- Alarcón, R.A. y Dransfield, E. (1990). *Acceleration of proteolysis in beef by addition of calcium ions. Proceedings 36<sup>th</sup>*, International conference of meat and technology. La Habana, Cuba, pp 179-185.
- Ashie, I.N.A. Simpson, B.K. y Ramaswuam, 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.
- Ayensa M. G., An, H. Gómez, G. M. C., Montero, P. y Borderías, A. J. (1999). "Partial pepsin activity characterization of squid (*Todaropsis eblanae*) mantle", *Food Sci. Tech. Int.*, 5:391-396.
- Badui, D.S. (1999). *Química de alimentos*, Edit. Pearson Educación, 3ª edición, México, 135-142 pp.
- Bandman, E. (1994). "Química de los tejidos animales", *En Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*, 2ª edición, Zaragoza, España, Editor James F. Price, Edit. Acribia pp 11-58.
- Beyond, R.J. y Bond, J.S. (1994). *Proteolytic Enzymes, A practical approach*, Edit. Oxford University Press, New York. pp 1-46.
- Carballo, B. y López De T. (1991). *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.
- Cendero, L. (1971). *Zoología Hispanoamericana-Invertebrados*, Edit. Alhambra, Zaragoza, España, p 58-76.

Croall, D.E., Slaughter, C.A., Wortham, H.S., Skelly, C.M., De Oigny, L. y Moomaw, C.R. (1992). "Polyclonal antisera specific for the proenzyme from of each calpain", *Biochem. Biophys. Acta*, 1121:47-53.

Cross, H.R. (1994). "Características organolépticas de la carne. Parte I. Factores sensoriales y evaluación". En *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. 2ª edición, Editado por James F. Price, Zaragoza, España, pp 279-295.

Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E. y Stromer, M.H. (1976). "A  $Ca^{2+}$  Activated protease possibly involved in miofibrillas protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme", *Biochem*, 15:2159-2167.

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.

Dublan, G. (2001) "*Evaluación de la actividad proteolítica del manto de calamar gigante*", UAM, Mexico.

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. (1982a). "Crecimiento del calamar gigante *Dosidicus gigas* en el Golfo de California, México, durante 1980", *Ciencia pesquera* 3:33-39.

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.

Etherington, D.J. (1984). "The contribution of proteolytic enzymes to *postmortem* changes in muscle", *J. Anim. Sci.* 59:1644-1649.

Fareu, E. (1992). *Japón la pesca de calamar*, Equinox, Vol. 37: 29-37.

Fennema. O.R. (1985). *Food Chemistry*, 2ª Edición, Marcel Dekker, Inc. New York. USA.

- Flores, J. Y Bermell, S. (1984a). "Estructura, composición y propiedades bioquímicas de las proteínas miofibrilares", *Rev. Agroquim. Tecnol. Alimt*, 24:140-150.
- Flores, J. y Bermell, S. (1984b). "Propiedades funcionales de las proteínas miofibrilares: capacidad de retención de agua", *Rev. Agroquim. Tecnol. Alimt*, 24:151-158
- Greaser, M. L. y Fritz, J. D. (1995). "Postmortem changes in myofibrillar proteins in relation to meat texture", *Ecceamst*. pp 293-309.
- 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.
- García, M. & López, A. (1994). *Bioteología alimentaria*, Limusa, México.
- Gacesa, P. & Hubble, J. (1990). *Tecnología de las enzimas*, Acribia Zaragoza, España.
- Gómez-Guillen M.C. & Montero P. (1997). "Improvement of giant squid (*Dosidicus gigas*) Muscle gelation by using gelling ingredients", *Lebensm Unters Forch A.*, Vol. 204: 379-384.
- 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.
- Guerrero Legarreta, Isabel y Mario Ricardo Arteaga. (1995). *Elaboración y preservación de productos cárnicos*, Tecnología de carnes, Ed. Trillas, UAM. México.
- Haard, N. F. (1994). "Protein laboració in seafoods", *En Seafood. Chemistry, processing technology & quality*, Edited by F. Shahidi & J.R. Bolta, Blackie Academic & Professional, p. 10-27.
- 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(2): 241-246.
- Harada, K. (1975). "Studies on enzymes forming formaldehyde and dimethylamine in fish and selfish", *J. Shimonoseki Univ. Fisheries* 23(3), 163.

Huidobro, Almodena. *Solubilization of protein aggregates formed during frozen of hake, sardine and mixed minces*. WEFTA Meeting, Madrid, Spain. October 19-22-1997.

Hultin, H. O. (1993). "Características del tejido laborac". En: *Química de los alimentos*. Director Fennema, O. R. laborac 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.

Jaarseld, F.P., Naudé, R.J. y Oelofsen, W. (1997). "The effects of Ca<sup>2+</sup> ions, EGTA and storage time on myofibrillar protein degradation, levels of Ca<sup>2+</sup>- dependent proteasas and cathepsins B, H, L, and D of ostrich skeletal muscle", *Meat Sci*, 45:517-529.

Juárez, Z. S. (1978). *Inspección sanitaria del calamar (Loligo Ssp) fresco y refrigerado en base a sus características organolépticas*, Tesis licenciatura Médico Veterinario Zootecnista, UNAM.

Kimura s., Nagaoka, Y., & Kubota, M. (1969). *Studies of marine invertebrate collagens. I. Some collagens from crustaceans and mollusks*, Bull, Jpn, Soc. Sci, Fisch, Vol. 35: 743.

Kolodziejka, I., Niecikowska, C. y Sikorski, Z.E. (1994). "Dimethylamine and formaldehyde in cooked squid *Illex argentinus* muscle extract and mantle", *Food Chem*. 50:281-283.

Kolodziejka, I. y Sikorski, Z. E. (1996). "Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates", a review. *J. Food Biochem*. 20, 349-363.

Kolodziejka, 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.

Konno, K. Y Fukazawa, Ch. (1993). *Autolysis of squid mantle muscle protein as affected by storage conditions and inhibitors*, *J. Food Sci.*, 57:1198-1202.

Koohmaraie, M. (1990). "Quantification of Ca<sup>2+</sup> dependent protease activities by hydrophobic and ion-exchange chromatography", *J. Anim. Sci.*. 70:3071.

- Koohmaraie, M. (1992). "Effect of Ph, temperature and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle  $\mu$ -calpain", *J. Anim. Sci.* 70 :3071-3080.
- Koohmaraie, M., Kennick, W. H., Elgasim, E. A., y Anglemier A.F. (1984). "Effects of *postmortem* storage on muscle protein degradation: analysis by SDS-polyacrilamide gel electroforesis", *J. Food Sci.* 49:292-296.
- Kreuser, R.. (1981). "Squid-seafood extraordinary". *Infofish Marketing Digest*, 86, 29-32.
- Kunitz, M. (1947). "Crystalline soybean trypsin inhibitor, II General properties", *J. Gen. Physiol.* 30:291-310.
- Lawrie, R. A. (1985). *Meat Sci*, Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, London. pp 91-158.
- Lenhinger, A. L. (1993). *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2º Edición, Ediciones omega, laboraci, España.
- Lewin, S. (1974). "Displacement of water and its control of biochemical reactions", *Academic Press*. New York.
- Lindsay, R. C. (1993). Flavor. En: Fennema, O. R. *Química de los alimentos*. p 660-706.
- López, L.R.F., (1984). *Elaboración de un embutido tipo salchicha a base de calamar (Dosidicus gigas)*, Tesis Licenciatura Médico Veterinario Zootecnista. UNAM.
- Makinodan, Y., Yokoyama, Y., Konoshita, M. y Toyohara, H. (1982). "Characterization of an alkaline proteinase of fish muscle", *Compl. Biochem. Physiol.* 87B, 1041-1046
- Malu, A. (1981). "Japón sinónimo de calamar". *La pesca mexicana*, 157-14
- C.P Mallet, (1993). *Frozen food technology*, London Blackie Academic and Professional.
- Morales, J.J. (1981). "Los calamares mexicanos", *La pesca mexicana*. Vol. 32 157-14

- Navarro, V. D. E. (1999). *Estudio De la Inspección de dimetilamina y formaldehído en el tejido Inspección de organismos marinos por efecto de la Inspección*. Servicio social. UAM-I.
- Inspección, C. (1998). *Guía didáctica. Deterioro del pescado*, Facultad de Veterinaria, Inspección de la República, Instituto de Inspecciones pesqueras.
- Oliveira, C. (1998). *Guía didáctica. Deterioro del pescado*, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Instituto de investigaciones pesqueras.
- Otwell, W.S. y Giddings, G.G., (1980). "Scanning electron microscopy of squid, raw, cooked and frozen mantle", *Mar. Fish. Rev.*, 42 (7-8), 67.
- 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., nspe, 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, Inspección Autónoma de Chihuahua.
- 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.
- Pedersen, J.W. "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.
- Pedersen, Ch. M.L. e Inspecc, 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 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.

- 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, Inspección Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Reedy, A.S.N., Safadi, F., Beyette, J.R. y Mykles, D.L. (1994). "Calcium dependent proteinase activity in root cultures of arabidopsis", *Biochem. Bioph. Res*, 199:1089-1095.
- Rodger, G; Weddle, R.B.; Craig, P.; Hasting, R. (1984). "Alkaline protease activity affect on some properties of comminuted squid", *Journal of food science*, Vol. 49: 117-123.
- Rosmini, M. R., López-Álvarez, J.A. & Fernández-López J. (2000). *Nuevas tendencias en la tecnología e higiene en la tecnología cárnica*. Inspección Miguel Hernández: escuela superior de Orihuela, Departamento. Tecnología Agroalimentaria Inspección Nacional del Litoral, Facultad de ciencias veterinarias, España 31-37.
- Sakai, J.; Sakaguchi, Y. & Matsumoto, J.J. (1981). "Acid proteinase activity of squid mantle muscle: some properties and subcellular distribution", *Comp. Biochem. Physiol*, Vol 70-B (4), 791-794.
- Sakai, J. & Matsumoto, J.J. (1981). "Proteolytic enzymes of squid mantle muscle", *Comp. Biochem. Physiol*. Vol 68-B. 389-395.
- SEMARNAP, INP, (2000). *Carta Nacional Pesquera*.
- Sikorski, Z.E. (1994). "The myofibrillar proteins in seafoods", En *Seafood proteins*, p 40-57.
- Sikorski, Z.E. y Pan, B.S. (1994). "Inspección", En *Seafood proteins*. Editores: Sikorski, Z.E., Pan, B.S. y Shahidi, F. Pp 1-5.
- Sikorski, Z.E. y Pan, B.S. (1994). "The involment of proteins and nonproteins nitrogen in postmortem changes in seafoods", En *Seafood proteins*, Editores: Sikorski, Z.E., Pan, B.S. y Shahidi, F. pp 71-75.
- Sorimachi, H., Saido, T. y Suzuki, K. (1994). *Discovery of tissue-specific calpains*, *FEBS Lett*, 343:1-5.

- Sorimachi, H., Kimura, S., Kinbara, K., Kazacama, J., Takahashi, M., Yajima, H., Ishiura, S., Sasagawa, N., Nonaka, I., Sugita, H., Maruyama, K. y Suzuki, K. (1996). "Structure and physiological functions of ubiquitous and tissue-specific calpain species". *Advan. Bioph.* 33:101-122.
- Suzuki, A. Yamadera, Y., Kido, K. Y Watan, K. (1997). "Sarcomere shortening and contraction nodes in stretched restrained ovine myofibres during post mortem storage", *Meat Sci.* 46:339-348.
- Taylor, R.G. y Goll, D.E. (1995). "Enzyme localization during *postmortem* muscle tenderization", *Ecceamst.* Pp 347-358.
- Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F. Koohmaraie, M. y Goll, D.E. (1995a). "Is Z-disc degradation responsible for *post-mortem* tenderization?", *J. Anim. Sci.*, 73:1351-1367.
- Thomson, B.C., Dobbie, P.M. Singh, K. y Speck, P.A. (1996). "*Post-mortem* kinetic of meat tenderness and the components of the calpain system in bull skeletal muscle", *Meat Sci.*, 44:151-157.
- Toldrá, F. y Etherington, D. (1988). "Examination of cathepsins B, D, H y L activities in dry-cured hams", *Meat Sci.*, 23:1-6.
- Ueng, Y. E., and Chow, Ch. J. (1998). "Textural and histological changes of different squid mantle muscle during frozen storage", *J. Agric. Food Chem* 46, 4728-4733.
- Vargas, S. S. (1980). *Inspección sanitaria del calamar (Loligo spp) con base sus cambios orgañoalépticos post-cocción*, Tesis licenciatura, Médico Veterinario Zootecnista, UNAM.
- Villanua Funguirino León traductor (1990). *Alimentos congelados procesados y distribución*. Instituto Nacional del frío, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1990.
- Wasson, D. H., Babbit, J. K. y French, J. S. (1992). "Characterization of a heat stable protease from arrowtooth flounder; *atheresthes stomias*", *J. Aquat. Food Prod. Technol*, 1:167-182.
- 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.

Whitaker, R. J. (1972). *Principles of enzymology for science*, Marcel Deker, Inc, New York, USA.

Woyewoda B.K. (1996). "Control of endogenous enzyme activity in fish muscle by inhibitor and hydrostatic pressure using RMS", *J. Food Sci.*, 61:350-356.

Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S. Y Suzuki, K. (1995). "Calpain dissociates into subunits in the presence of calcium ions", *Biochem Bioph. Resear. Communic*, 208:376-383.

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.

Zdzislaw, E. (1994). *Tecnología de los productos del mar. Recursos, composición nutritiva y conservación*, Acribia, España,41-172 pp.

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

## 9. ANEXOS

### **Anexo I. Determinación de proteína por biuret** Gornall y col., 1949.

La reacción de biuret (Gornall y col., 1949) es una determinación colorimétrica de proteína basada en la unión de cobre  $2^+$  a las cadenas de péptidos de las moléculas de proteína a valores de pH alcalinos. Se forma un complejo violeta estable, el cual puede ser cuantificado por absorción a 310nm o a 540-560nm.

#### **Reactivos.**

*biuret* (Gornall y col., 1949). En un vaso de 1000ml se adicionan 200ml de agua destilada y 90g de NaOH (J.T.Baker, México), se agitan hasta disolver completamente. Se disuelven 1g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Técnica Química, México) en 200ml de agua destilada en un vaso de 500ml.

Se adicionan lentamente y con agitación la solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  a la solución de NaOH. Se lleva a 500ml en el mismo vaso.

#### **Preparación de disoluciones.**

*Albúmina de bovino (0.3%)*. En un vaso de 25 ml, se pesan en balanza analítica 0.075g de albúmina (Sigma, USA). Se adicionan 10 ml de agua destilada para disolver parcialmente, y se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25ml y se afora con agua destilada.

*Solución de NaOH*. En un matraz aforado de 500ml, se disuelven 90g de NaOH (J.T.Baker, México) en 200ml de agua destilada, se afora y se mantiene en refrigeración.

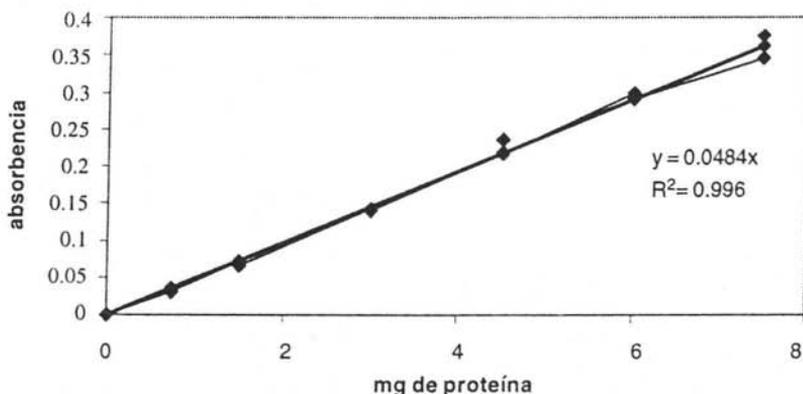
#### **Curva patrón de seroalbúmina para la determinación de proteína.**

#### **Análisis de proteína.**

1. Para la preparación de la curva estándar, se prepararon por triplicado tubos de ensaye con la solución de albúmina de 0 a 2.5ml, y llevándolos a 2.5ml con agua destilada.

2. Para el análisis de las muestras, por triplicado, se tomaron alícuotas de 0.5ml del sobrenadante. Adicionando 2ml de agua destilada.
3. A los tubos de la curva y de las muestras se adicionaron 2.5ml del reactivo de biuret, y se agitó con precaución usando vortex. Se mantuvieron a temperatura ambiente por 20 minutos hasta el desarrollo del color violeta.
4. Si presentaban turbidez las muestras, se preparaban otros tubos como en el inciso 2 y se adicionaban 2.5ml de la solución de NaOH, y se mezcló con vortex.
5. Se midió la absorbancia (T) a 540nm de los tubos preparados para turbidez del inciso 4, ajustando a cero con el blanco de turbidez.

Se volvió a ajustar el espectrofotómetro a cero con el blanco de biuret y se midió la absorbancia (B) de los tubos de la curva y de la muestra conteniendo el reactivo de biuret (punto 3).



Gráfica 12. Curva patrón para determinación de proteína por el método de biuret (cada punto se determinó por triplicado)

**TABLA 31. LÍMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BIURET**

mg de proteína	Absorbencia
0	0
7.5	0.3603

## **Anexo II. Elaboración de geles de poliacrilamida.**

Para la elaboración de los geles de poliacrilamida es necesario la preparación de los reactivos que se mencionan a continuación:

1. Disolución de acrilamida /bis. Pesar 14.6g de acrilamida, 0,4g de N'N'-bis-metilen-acrilamida, disolver en 35 mL de agua y aforar a 50 mL.
2. Amortiguador Tris-HCL 1.5M, pH 8.8 (para gel de separación). Pesar 18.15g de base-Tris y aforar a 100 mL, ajustar a pH con HCL 6N.
3. Amortiguador Tris-HCL 0.5M, pH 6.8 (para gel de concentración). Pesar 6.0g de base-tris y aforar a 100 mL, ajustar a pH 6.8 con HCL 6N.
4. Amortiguador 5X, pH 8.3 (para cada corrida). Pesar 9.0g base-tris, 43.2g de glicina y 3g de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) y adicionar a 600 mL. Para una corrida electroforética diluir 60 mL de amortiguador 5X con 240 mL de agua desionizada, para una corrida electroforética.
5. Persulfato de amonio al 10%. Disolver 0.1g en 1 mL de agua. Este reactivo se prepara al momento de su utilización.
6. Colorante azul de bromofenol. Agregar 0.01g de azul de bromofenol en 172.5 mL de NaOH 0.1 M y aforar a 25 mL.

7. Colorante para corrida de muestras. Mezclar 3.8 mL de agua desionizada, 1.0 mL de Tris-HCl pH 6.8, 0.8 mL de glicerol, 0.4 mL de 2-mercaptoetanol y 0.4 mL de azul de Coomasie y aforar a 100 mL en disolución desteñidora.
8. Disolución desteñidora. Se prepara con ácido acético, metanol y agua destilada en proporciones de 10:40:50, respectivamente.

**Preparación de los geles.** La preparación de geles se divide en:

a) *Gel de separación*

Se prepara 10 mL de gel de separación utilizando una T=10% como se indica en la Tabla 32.

TABLA 32. REACTIVOS GEL DE SEPARACIÓN (T=10%)

Reactivos	Cantidad
Agua desionizada	4.02 mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	2.5 mL
10% SDS	100 $\mu$ L
Acrilamida/bis	3.33 mL
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	5 $\mu$ L

Esta mezcla se degasificó durante 15 minutos utilizando vacío, transcurrido este tiempo se adicionó persulfato de amonio (10%) y TEMED. Colocar inmediatamente esta mezcla entre las placas de vidrio previamente montadas. Después de transcurrido unos minutos se adicionó gotas de agua para evitar la resequedad de los geles. Se dejó reposar durante una hora para asegurar la gelificación total.

b) *Gel de concentración*

Se preparó 5 mL de gel de concentración con una T=4%, utilizando las proporciones indicadas en la Tabla 33.

TABLA 33. REACTIVOS GEL DE CONCENTRACIÓN (T=4%)

Reactivos	Cantidad
Agua desionizada	3.05 mL
Disolución amortiguadora pH 8.8	1.25 mL
10% SDS	50 $\mu$ L
Acrilamida/bis	1.665 mL
Persulfato de amonio 10%	50 $\mu$ L
N, N, N', N'-Tetrametilendiamina (TEMED)	5 $\mu$ L

La disolución se desgasifica durante 15 minutos utilizando vacío, transcurrido el tiempo se adiciona persulfato de amonio (10%) y TEMED. Se elimina el agua de los geles anteriores e inmediatamente se colocó esta mezcla en las placas de vidrio, acto seguido, se colocan los peines para marcar los carriles, en los cuales se inyectan las muestras.

### Preparación de las muestras

La preparación de la muestra para la corrida de los geles se realiza de la siguiente manera: se mezclan en una relación 1:4 muestra: amortiguador muestra. La muestra se hierve durante 5 min y se centrifuga por 5 min. a 13,000 rpm. Finalmente se toman 20  $\mu$ L de cada una de las muestras para ser inyectadas en los geles.

### Condiciones de electroforesis

Se monta el equipo de electroforesis, el cual consta de una cámara de electroforesis (BIO-RAD Mini-PROTEAN II Cell). Los geles se preparan entre dos placas de vidrio cuyas dimensiones fueron 72.101 mm, utilizando separadores de 0.75 mm y un peine del mismo espesor. Para el corrimiento electroforético se utiliza una fuente de poder (BIO-RAD Power Pak 300), con las condiciones óptimas de corrida (200V).

Una vez colocados los geles e inyectado las muestras se deja correr durante 55 min. Tiempo aproximado para que el colorante azul de bromofenol alcanzara la parte final del gel. Una vez transcurrido el tiempo los geles se tiñeron con azul de Coomassie por 30-40 min., finalizando este tiempo se

colocan en una disolución desteñidora, con recambios necesarios de esta disolución, de forma que se pudieran ver con claridad las proteínas en estudio.

Las muestras se diluyeron 1:1 con amortiguador muestra con  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -MCE). Se prepararon geles discontinuos verticales de 8x10x0.07 cm, de 10% de acrilamida, SDS para gel de separación y de 4% para el gel de concentración, se empleó un equipo de electroforesis Mini-Protean II Slab.Cell de Bio-Rad (Reichmond, CA). Se aplicó un tratamiento térmico previo a las muestras de 2 min en ebullición y se centrifugaron 2min. a 12000rpm. Se inyectó un volumen de 20 microlitros de cada muestra y 10 microlitros del marcador de pesos moleculares. El análisis se llevó a cabo a un Voltaje constante 190 v por gel, aproximadamente por 1 hr. Después del análisis, los geles se desmontaron y se enjuagaron con agua destilada y en un sólo paso se fijaron y tñieron con una solución de azul de Coomasie R-250 0.1% durante 30 min, se destñieron durante 45 min con una solución de metanol 40%-ácido acético 20%. Una vez evaluados los geles se colocaron en agua destilada para evitar que se siguieran destñiendo, para analizarlos por densitometría. Se calcularon los pesos moleculares de las bandas con respecto al Rf del marcador realizando una curva patrón con el Log PM contra Rf; se empleó un densitómetro UltraScan XL de Pharmacia LKB (Bromma, Suiza), para así comparar los patrones electroforéticos mediante los parámetros de movilidad relativa y concentración relativa (área y posición de cada banda).

La digitalización y análisis de los geles se llevó a cabo mediante un equipo Gel Doc 1000 (BioRad,). 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). La elaboración de los reactivos se describe en el Anexo III.

### Anexo III. Reactivo para la determinación de proteína soluble en sal

Disolución de extracción: 5% NaCl en un buffer 0.003M de NaHCO<sub>3</sub> pH 7. Se disuelven 0.252g de NaHCO<sub>3</sub> (J.T.Baker, México) y 50g de NaCl (J.T.Baker, México) en un matraz y se aforan a 1000ml con agua destilada, y se almacena en refrigeración.

### Anexo IV. Preparación de disoluciones detergentes

**Disolución de SDS al 2%.** En un vaso de 100ml, se disuelven 2 g de doedecil sulfato de sodio SDS (Reasol, México) en 50ml de agua destilada, se completa el volumen y se mantiene en refrigeración.

**Disolución de urea 8 M.** En un matraz aforado de 500ml, se disuelven 480.48 g de (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO (Sigma, USA) en 200ml de agua destilada, se afora y se mantiene en refrigeración.

**Disolución de mercaptoetanol al 5%.** En un vaso de 100ml, se disuelven 5 g de mercaptoetanol (Sigma, USA) en 50ml de agua destilada, se completa el volumen y se mantiene en refrigeración.

### Anexo V. Soluciones de baja y alta fuerza iónica para la extracción de proteínas miofibrilares

TABLA 34. DISOLUCIONES DE BAJA Y ALTA FUERZA IÓNICA

Solución A			Solución B			Solución C		
NaCl	0.1M	5.841 g/L	NaCl	0.6M	35.0 g/L	NaCl	0.6M	35.0 g/L
MgCl <sub>2</sub>	2mM	0.18 g/L	MgCl <sub>2</sub>	5mM	0.476 g/L	Buffer fosfatos pH7, 10mM		
EDTA	1mM	0.3722 g/L	Na <sub>2</sub> P <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	5mM	2.23 g/L			
Dithiothreitol	0.5mM	0.0771 g/L	Buffer fosfatos pH6 50mM					
Buffer fosfatos pH6, 50mM								

Se disolvieron las sales en el orden en que se listan con el buffer adecuado.

Nota 1: para preparar los buffer, se pesaron y disolvieron las sales en un vaso de precipitados de 100ml, adicionando 90ml de agua desionizada, verificando el pH con potenciómetro previamente calibrado (ajustando si era necesario con NaOH 1M), y posteriormente aforando a 100ml.

Nota 2: todos los reactivos son marca J.T.Baker, México, a excepción de ditioneitol de Sigma, USA

## **Anexo VI. Determinación de formaldehído**

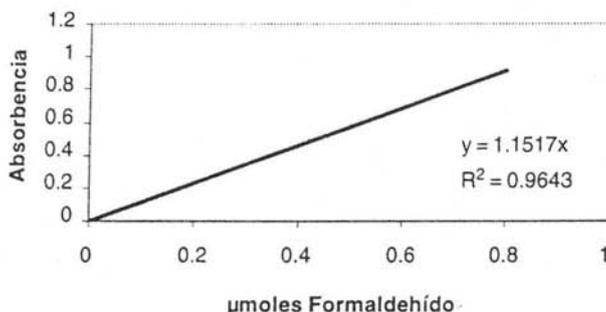
### **a) Reactivos para la determinación de formaldehído**

- Ácido perclórico 6%. En un vaso de precipitados de 100ml, se pesaron 8.57g de HClO<sub>4</sub> (J.T.Baker, México) al 70% de grado reactivo. Se disolvió en agua destilada, y se aforó en un matraz aforado a 100ml.
- Hidróxido de potasio 30%. Se disolvieron 30g de KOH (J.T.Baker, México) en 65ml de agua destilada. Se enfrió y se aforó a 100ml.
- Buffer estándar. Se emplearon soluciones comercialmente disponibles en pH 4 y 7 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA).
- Reactivo de Nash.
  - a) Se combinaron 2ml de acetyl acetona (J.T.Baker, México) con 75ml de agua destilada en un matraz erlenmeyer. Se tapó y se agitó vigorosamente.
  - b) En un vaso de 500ml, se disolvieron 150g de acetato de amonio (J.T.Baker, México) en 300ml de agua destilada.
  - c) Se combinaron las dos soluciones y se diluyeron a 500ml.
- Formaldehído 1M. En un matraz de 100ml, se pesaron 8.12g de una solución 37% peso en peso de formaldehído (J.T.Baker, México) y se aforó hasta 100ml con agua destilada.

**b) Análisis de formaldehído.** Se pipetearon alicuotas (0.5 a 2.5ml) del extracto de ácido perclórico en tubos de ensayo.

*Curva estándar.*

- Se diluyó 1ml de la solución de HCHO 1M en 100ml de agua destilada.
- De esta solución se tomaron 2ml y se diluyeron en 100ml de agua destilada.
- Se tomaron alicuotas para obtener concentraciones finales de 0, 0.2, 0.4, 0.6, y 0.8  $\mu$  moles de HCHO.
- Se diluyeron las muestras y los estándares a 5ml con agua destilada.
- Se adicionaron 2.5ml del reactivo de Nash y se mezcló bien con vortex.
- Se calentaron los tubos por 10 minutos en baño de agua a 60°C.
- Finalmente se leyó la absorbencia a 415nm.



Gráfica 13. Curva patrón para determinación de formaldehído (determinada por triplicado).

Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo del calamar

**TABLA 35. LÍMITES DE DETECCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO**

<b>µmoles de HCHO</b>	<b>Absorbencia</b>
0	0
0.8	1.0152

### **Anexo VII. Disoluciones para la determinación de CRA**

#### **Disolución de 0.6 M de NaCl.**

En un matraz aforado de 500ml, se disuelven 35.064 g de NaCl (J.T.Baker, México) en 200ml de agua destilada, se afora y se mantiene en refrigeración.

### **Anexo VIII. Disoluciones para la determinación de pH**

Para la determinación de pH se emplearon disoluciones comerciales de buffer de fosfatos a pH 7 y 4 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA)