Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

EFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD GELIFICANTE DEL MÚSCULO DE CALAMAR GIGANTE (*Dosidicus gigas*) Y SU RELACIÓN CON LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LAS PROTEÍNAS

POR

CARLOS ROBERTO SOTELO ROMERO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACION DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA NOVIEMBRE DE 2011

CARTA DE APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Carlos Roberto Sotelo Romero, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, dentro del Programa de Maestría en Ciencias del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director de Tesis

Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez

Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo

M. C. Guillermina García Sánchez

DECLARACION INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del Director o Directora de la tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

C.I.A.D., A.C.

DEDICATORIA

A Karen, con todo mi amor, por el apoyo que me ha brindado y por toda la felicidad que ha traído a mi vida.

A mis padres, Alma y Humberto, con todo mi cariño y agradecimiento, por la confianza y apoyo incondicional para alcanzar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), por permitirme formar parte de su programa de posgrados para realizar mis estudios de maestría.

A **Dios**, por brindarme la oportunidad de desarrollarme intelectual, académica y personalmente, a través de la realización privilegiada de una maestría en el CIAD, uno de los mejores centros de investigación del país en el área de alimentos.

A mi pareja **Karen Chávez**, por su compañía, cariño y gran apoyo, pero sobre todo, por la enorme paciencia que me tuvo en estos dos años debido a mis ausencias, desatenciones y malos humores. Si no fuera por ti hermosa las cosas me hubieran sido muy difíciles. Siempre fuiste un gran apoyo en esta etapa tan importante de mi vida.

A mis padres, **Alma** y **Humberto**, por su apoyo incondicional y por sus consejos que me han dado la fuerza de seguir adelante. Yo sé que muchas veces se callaron sus problemas para no distraerme de mi objetivo.

A mis hermanos **Omar** y **Humberto**, por su interés, apoyo y buenos deseos.

A mi director de tesis, **Dr. Ramón Pacheco Aguilar**. Porque a pesar de la ardua tarea y numerosos compromisos que conlleva ser el director general de esta gran institución, siempre estuvo disponible para asesorarme, guiarme y hacer los comentarios precisos y preguntas precisas. Dice la frase que: “el alumno siempre debe superar al maestro”… ¡De verdad que me fija una meta muy alta!

En forma especial a la **M. C. Guillermina García Sánchez**, por la eficiente tarea realizada en el apoyo logístico, técnico y moral durante el transcurso de

esta investigación. Personas como usted maestra, hacen la diferencia. Muchas gracias.

A mis asesores de comité: **Dr. Juan Carlos Ramírez Suárez** y **Dr. Rogerio Rafael Sotelo Mundo**, por el tiempo que me dedicaron, por sus sugerencias, ideas y enseñanzas.

A las **M. C. María Elena Lugo Sánchez** y **M.C. María Gisela Carvallo Ruiz**, por su apoyo incondicional dentro y fuera del laboratorio. También por su apoyo logístico, técnico, instrumental y humano durante los diferentes muestreos y análisis realizados. De verdad que su actitud hizo mi estancia muy amena.

A **Gabriel Fuente Gómez**, por su amistad, compañía y apoyo desinteresado durante estos 3 años desde que llegamos de La Paz.

A mis compañeros de laboratorio, **Marco Santiz**, **Aristeo Villalobos**, **Julio López**, **Josúe López**, **Mariel López**, **Ana Gloria Villalba**, **Wendy Lizárraga**, **Nallely Gallardo** y **Aarón Salazar**. Por su compañerismo y apoyo cuando se necesitó. Gracias a todos.

Al **Ing. Germán Cumplido Barbeitia**, por su apoyo técnico y por haber facilitado los equipos que se requirieron en el procesamiento de la materia prima utilizada en esta investigación. También al **Dr. Humberto González**, por su asesoría en el diseño estadístico del experimento.

Al **Dr. Enrique Márquez Ríos**, por su apoyo teórico-práctico para las evaluaciones de las técnicas de calorimetría diferencial de barrido e hidrofobicidad de superficie.

Al **Sr. Gerardo Reyna Cañez**, por su valioso apoyo técnico en la recabación y soporte documental en este trabajo de investigación. También al **Q. B. Fernando Alejo Leyva Livshin** y al **Sr. Luis Francisco Conde Ortiz**, por su apoyo técnico en la utilización de herramientas de búsqueda de revistas y servicios generales de biblioteca. También a la **Q. B. Norma Angélica García**

Sánchez, por su apoyo en la integración de las bases de datos bibliográficas del presente trabajo de investigación.

Al **M. C. Luis Enrique González Siqueiros** y a la **Q. B. Rosa Amparo Nieblas Almada**, por su apoyo técnico en la realización del análisis químico proximal que se llevó a cabo en la materia prima utilizada en esta investigación.

A todas las demás personas que participaron directa o indirectamente en esta investigación.

CONTENIDO

Introducción 1

Antecedentes 3

Aspectos Generales de la Pesquería del Calamar Gigante 3

Producción Pesquera y Disponibilidad 4

Importancia Económica y Comercialización 7

Productos con Valor Agregado 9

Organización Estructural y Composición del Músculo de Calamar 10

Estructura 11

Composición Proximal 11

Proteínas del Músculo 14

Proteínas Miofibrilares. 14

Proteínas Sarcoplásmicas. 17

Proteínas Estromales 17

Propiedades Funcionales del Músculo 18

Capacidad Gelificante 18

Proceso de Gelificación Térmica. 19

Extracción 19

Desnaturalización y Agregación 19

Estabilización 19

Factores que Afectan la Gelificación. 20

Concentración de Proteína. 21

Otros Factores. 22

Congelación y Almacenamiento en Congelación 23

Proceso de Congelación 23

Enfriamiento. 23
Nucleación. 24
Formación y Crecimiento de Cristales. 24
Recristalización. 25
Mecanismo de la Desnaturalización-Agregación Proteica 26
Desestabilización por Frío. 26
Concentración de Solutos. 27
Formación de Interacciones Intermoleculares. 27
Factores que Afectan a las Proteínas Durante la Congelación 29
Factores Intrínsecos 29
Temperatura del Hábitat. 29
Presencia de OTMA. 29
Oxidación de Lípidos. 30
Otros Factores. 31
Factores Extrínsecos 31
Ciclos de Congelación-Descongelación. 31
Velocidad de Congelación-Descongelación. 32
Temperatura de Almacenamiento. 33
Fluctuaciones de Temperatura. 34
Tiempo de Congelación. 34
Condición de la Materia Prima. 34
Estabilidad Funcional de la Miosina 37
Estabilidad de las Propiedades Funcionales del Músculo de Calamar en Congelación 37
Solubilidad en Sal. 38

Capacidad Emulsificante. 42
Viscosidad. 43
Capacidad Gelificante..... 44
Hipótesis..... 46
Objetivo General 47
Objetivos Específicos 47
Materiales y Métodos 48
Obtención y Preparación de la Materia Prima 48
Tratamientos 49
Proceso de Elaboración de Geles 52
Caracterización de la Materia Prima y de los Geles 53
Composición 53
pH 53
Evaluación de la Capacidad de Formar Geles (CFG) 54
Prueba de Doblado (PD) 54
Análisis de Perfil de Textura (APT) 54
Capacidad de Retención de Agua (CRA)..... 56
Evaluación de la Desnaturalización-Agregación Proteica 56
Hidrofobicidad de Superficie (SoANS) 57
Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) 58
Análisis Estadístico 60
Resultados y Discusión 62
Caracterización de la Materia Prima y Composición de los Geles 62
Peso-Talla del Manto de Calamar..... 62
Composición Química del Manto de Calamar 65

Curva de Congelación 68

Variación en la Composición Química de los Geles y pH del Músculo 70

Variación de la Composición Química con Respecto a la Temporada de Captura 71

Variación en la Composición Química Debido a la Congelación. 74

Efecto de la Congelación Sobre la Capacidad Gelificante 75

Efecto de la Congelación y Temporada de Captura 82

Efecto de la Congelación Sobre la Desnaturalización y Agregación de las Proteínas Musculares 83

Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) 84

Hidrofobicidad de Superficie 94

Conclusión 97

Bibliografía 99

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición química del calamar gigante 13

Tabla 2. Estudios realizados del efecto de la congelación sobre propiedades funcionales de diferentes especies de calamar. 39

Tabla 3. Escala de evaluación de la calidad de geles mediante la prueba de doblado. 55

Tabla 4. Contenido de humedad y proteína cruda de geles y valores de pH del músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C por muestreo 72

Tabla 5. Prueba de doblado (PD) y capacidad de retención de agua (CRA) de los geles de músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C 77

Tabla 6. Temperatura (T_{max}) y entalpia (ΔH) de desnaturalización térmica e hidrofobicidad de superficie (SoANS) del músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C 88

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía básica del calamar 3

Figura 2. Serie histórica de la producción de calamar en peso vivo 2000-2009 por estados..... 5

Figura 3. Volumen de la producción de calamar mensual en peso desembarcado en el 2008, 2009 y 2010. 6

Figura 4. Serie histórica del precio al menudeo y mayoreo del calamar en el distrito federal 2000-2009 8

Figura 5. Representación de la estructura del manto de calamar Loligo pealei.. .. 12

Figura 6. Representación esquemática de la miosina..... 16

Figura 7. Ejemplo de curva de enfriamiento del agua y de una solución acuosa..... 24

Figura 8. Diagrama de flujo del diseño experimental 51

Figura 9. Curva generalizada del análisis de perfil de textura..... 55

Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia del complejo proteína-ANS a diferentes concentraciones de proteína (a); Calculo de la hidrofobicidad de superficie (SoANS) como la pendiente de la Intensidad de fluorescencia a 470 nm con respecto a la concentración de proteína (b)..... 59

Figura 11. Peso y longitud de manto del calamar gigante por muestreo..... 63

Figura 12. Composición químico-proximal del músculo de calamar gigante por muestreo.. 66

Figura 13. Análisis de correlación entre el contenido de humedad y proteína cruda del músculo de calamar gigante..... 67

Figura 14. Curva de congelación del músculo de calamar gigante por convección de aire a -20 °C. 69

Figura 15. Análisis de perfil de textura (APT) de los geles de músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C. a) Muestreo de diciembre; b) Muestreo de mayo. 76

Figura 16. Picos de transición térmica promedio del músculo de calamar gigante obtenidas mediante calorimetría diferencial de barrido.. 85

Figura 17. Picos de transición térmica del músculo de calamar gigante fresco y congelado mediante calorimetría diferencial de barrido. 87

RESUMEN

En el presente estudio, se evaluó la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante después de ser congelado (-20 °C) y almacenado en congelación (1 y 30 días) bajo dos condiciones de manejo (entero y molido). El manto de calamar obtenido de dos muestreos en los meses de diciembre de 2010 y mayo de 2011, fue dividido en tres partes. Una parte fue molida y congelada (MC); otra parte, el manto entero fue congelado (EC) y otra parte, el manto entero se utilizó como control sin congelar. La capacidad de formar geles (CFG) del músculo MC y EC se evaluó después de 1 y 30 días de almacenamiento (MC1, EC1, MC30 y EC30), en términos del Análisis de Perfil de Textura (APT), Prueba de Doblado (PD) y Capacidad de Retención de Agua (CRA). Por otro lado, se evalúo la hidrofobicidad de superficie (SoANS) de las proteínas y su comportamiento térmico mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (CDB).

Las pruebas del APT, PD y CRA, no detectaron diferencias significativas ($p>0.05$) debido al efecto de la congelación, molienda o tiempo de almacenamiento. El valor de las variables del APT, PD y CRA de los geles hechos a partir de músculo fresco y el valor promedio de los hechos a partir de músculo congelado (MC1, EC1, MC30 y EC30) en el mes de diciembre fueron para la variable dureza: 861 y 886 gf/g de gel, cohesividad: 27.8 y 28.7 %, elasticidad: 46.4 y 49.1 %, PD: 3.6 y 3.5 y CRA: 4.9 y 4.8 $g_{H_2O}/g_{proteína}$, respectivamente; mientras que los valores registrados en el mes de mayo fueron para la variable dureza: 788 y 747 gf/g de gel, cohesividad: 28.2 y 29.7 %, elasticidad: 45.2 y 40.0 %, PD: 3.0 y 2.5 y CRA: 4.8 y 4.8 $g_{H_2O}/g_{proteína}$, respectivamente.

El análisis de CDB no detectó cambios ($p>0.05$) en la temperatura de transición (T_{max}) de la miosina (47.6 °C) en el músculo congelado, aunque presentó un incremento ($p\leq0.05$) en la T_{max} de la actina (de 78.2 a 78.6 °C)

debido al tiempo de almacenamiento, indicando que estas proteínas no se desestabilizan por la congelación ni por el almacenamiento en congelación. Sin embargo, se detectó un incremento ($p \leq 0.05$) del 18 y 30 % debido al efecto de la congelación-descongelación en la entalpía de transición (ΔH) de la miosina y actina respectivamente, sugiriendo la posible formación de agregados. Por otro lado, incrementos ($p \leq 0.05$) del 17.5 y 8.0 % en la SoANS, mostraron que las proteínas del músculo de calamar se desnaturalizaron debido al proceso de congelación-descongelación y tiempo de almacenamiento, respectivamente; observándose una ligera reducción ($p \leq 0.05$) del 6.9 % en la SoANS en el músculo congelado molido con respecto al entero, sugiriendo la desnaturalización-agregación de las proteínas debido al efecto de la molienda durante la congelación.

Los resultados de CDB y SoANS indican que las proteínas del músculo de calamar sufrieron cambios estructurales, desnaturalizándose y/o agregándose parcialmente debido a la congelación-descongelación, molienda y tiempo de almacenamiento. No obstante, los cambios fueron relativamente pequeños y no tuvieron un impacto negativo en la CFG del músculo. Este hallazgo proyecta nuevas oportunidades para el manejo y almacenamiento en congelación del músculo de calamar gigante como materia prima para la elaboración de productos con valor agregado, ya que éste no requiere condiciones rigurosas de almacenamiento ni la adición de aditivos para conservar su funcionalidad durante el almacenamiento en congelación.

INTRODUCCIÓN

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es considerada una especie subvaluada en México. A pesar de que la captura de calamar representa el 3.3 % de la producción total nacional de productos pesqueros, su valor comercial representa sólo el 1.2 % del total del ingreso del sector pesquero en México (Conapesca, 2009). Esto se debe al bajo valor comercial del calamar gigante, primordialmente influenciado por la demanda del mercado externo (principalmente el asiático) (Salinas-Zavala *et al.*, 2003), las procesadoras de la región y debido a un mercado nacional poco desarrollado (De la Cruz-González et al., 2007).

Para fortalecer la comercialización del calamar gigante es necesario desarrollar el mercado nacional (Luna-Raya *et al*., 2009). Esto se puede lograr a través del fomento al consumo y mediante el desarrollo de productos con valor agregado, ya que en general, se desconoce el producto, su manera de preparación y la principal presentación en la que se ofrece al consumidor final es fresco y congelado (96.5 %) (Conapesca, 2009; Luna-Raya *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha identificado una tendencia hacia el consumo del calamar gigante en forma de productos con valor agregado (Luna-Raya *et al.*, 2006, 2009). Así, para diversificar la presencia de la especie en el mercado nacional, se ha realizado investigación con el objetivo de generar procesos para el desarrollo de productos con valor agregado elaborados a partir de músculo de calamar gigante. Algunos de estos productos incluyen concentrados húmedos de proteína tipo-surimi (Dihort-García *et al.*, 2011; Palafox-Carlos *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009; Cortés-Ruiz *et al.*, 2008), imitación de filetes de pescado reestructurados (Campo-Deaño *et al.*, 2010), productos tipo gel-emulsificados (Félix-Armenta *et al.*, 2008) e hidrolizados de proteína (De La Fuente-Betancourt *et al.,* 2008). Estos estudios han demostrado que es posible darle valor agregado al calamar gigante mediante la aplicación de tecnologías nuevas o tradicionales.

Paralelamente otros estudios se han enfocado a evaluar el efecto de diversos factores de procesamiento y conservación como son el pH, fuerza iónica (Rocha-Estrada *et al.*, 2010), utilización de agentes gelificantes (Gómez-Guillén y Montero, 1997) y almacenamiento en hielo (Ramírez-Suárez *et al.*, 2008), sobre las propiedades funcionales de las proteínas presentes en el músculo de calamar gigante. Sin embargo, existe poca información acerca de otros factores importantes que pueden influenciar la funcionalidad de las proteínas musculares de esta especie, como es el almacenamiento en congelación.

La congelación es considerada el método clásico de preservación de productos pesqueros. Sin embargo, es bien conocido que la congelación y el almacenamiento en congelación producen un efecto negativo sobre la funcionalidad de las proteínas musculares, debido tanto a factores extrínsecos (Matsumoto, 1979; Park, 1994; Evans, 2008) como intrínsecos (Carvajal *et al.*, 2005).

A pesar de lo anterior, estudios indican que las proteínas del músculo de diversas especies de calamar presentan estabilidad durante su almacenamiento en congelación en términos de solubilidad (Mignino *et al.*, 2008), capacidad emulsificante (Ruíz-Capillas *et al.,* 2003) y viscosidad (Gómez-Guillén *et al.,* 2003). Sin embargo, el impacto de la congelación y almacenamiento en congelación sobre la capacidad gelificante de las proteínas musculares de calamar gigante ha sido escasamente abordado.

Debido a que el calamar gigante es conservado principalmente en congelación por la industria nacional (Conapesca, 2009), el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la congelación del músculo de calamar gigante a -20 °C sobre su capacidad de formar geles bajo dos condiciones diferentes de almacenamiento (entero y molido).

ANTECEDENTES

Aspectos Generales de la Pesquería del Calamar Gigante

El calamar gigante, *Dosidicus gigas*, es un organismo que pertenece a la clase Cephalopoda, orden Theuthida y familia Ommastrephidae (Nigmatullin *et al.*, 2001). Es un invertebrado de crecimiento rápido con un sistema nervioso complejo y un sistema visual bien desarrollado. El cuerpo del calamar está dividido en dos regiones (Figura 1), los brazos, que están unidos a la cabeza (de ahí se deriva el término cefalópodo) y el manto, que se caracteriza por ser de forma cilíndrica, el cual envuelve a los órganos internos (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997).

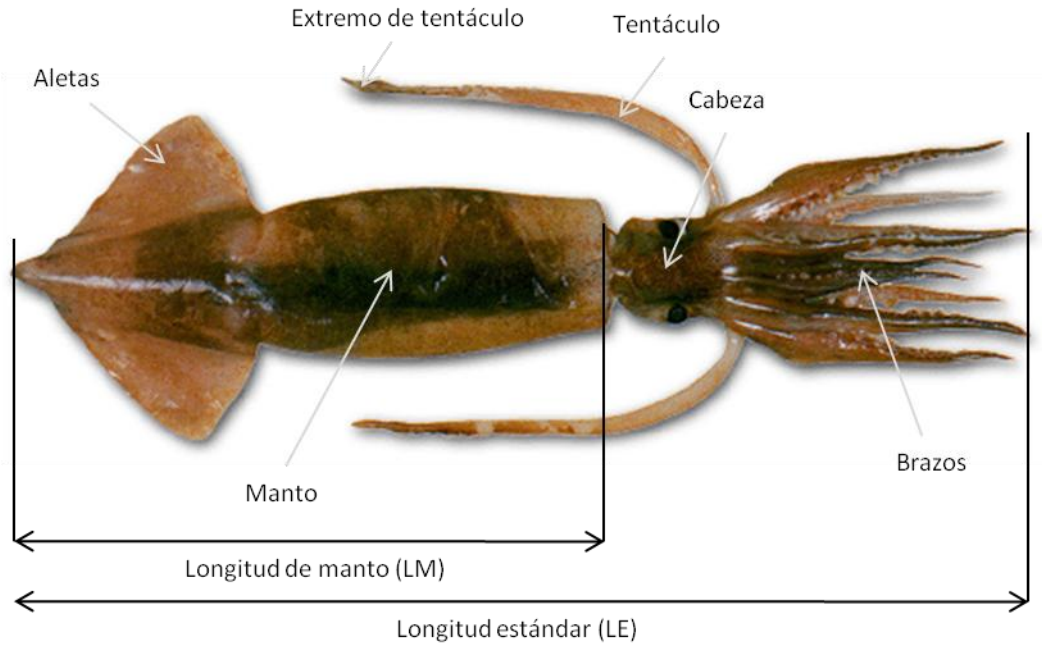

Figura 1. Anatomía básica del calamar. Adaptada de O´Shea (2007).

Producción Pesquera y Disponibilidad

El calamar gigante es un organismo pelágico que representa el 95 % sobre el total de las especies de calamar. Esta especie es más abundante en la zona de captura de Guaymas (Sonora) y Santa Rosalía (Baja California Sur), lo que puede estar asociado a la abundancia de pelágicos menores como la sardina (Nevárez-Martínez *et al.,* 2000). Debido a esto, el estado de Sonora y Baja California Sur representan el 88 % de la captura de calamar gigante con respecto a la captura total nacional (Conapesca, 2009).

La captura total nacional de calamar gigante ha presentado gran variabilidad en los últimos diez años (Figura 2). En el periodo del 2000 hasta el 2002, se presentó un incremento en la captura de calamar, siendo el 2002, el año de mayor producción de los últimos 10 años. Después de este periodo se presentó un decremento y estabilización de la captura hasta el año 2007, con un repunte en el año 2008 y una nueva caída en el 2009.

Los meses en los que se reporta una mayor abundancia del recurso en los últimos tres años (Figura 3) corresponden a junio y julio, con una caída en la captura en el periodo de agosto-octubre, e incrementos en los meses de Enero a Mayo.

El fenómeno del niño es un factor que afecta la disponibilidad del calamar gigante (Bazzino *et al*., 2007). Durante este fenómeno puede suceder una significativa migración de la especie desde el pacífico norte hacia las costas peruanas, lo que se refleja en caídas de la captura como sucedió en 1982, 1997, 2000, 2005-2007 (Nevárez-Martínez *et al.,* 2000). Esto, se debe principalmente a que al aumentar la temperatura superficial del agua, el calamar no emerge a aguas superficiales y no puede ser capturado por medio del arte de pesca que se practica en la región (poteras a mano). En junio-julio de 2009, se anunció la aparición de este fenómeno con el incremento de 1 °C en la temperatura de las agua superficiales, lo que coincidió con la caída de la captura observada en los meses de octubre-diciembre de 2009 y septiembre-diciembre de 2010 (Figura 3).

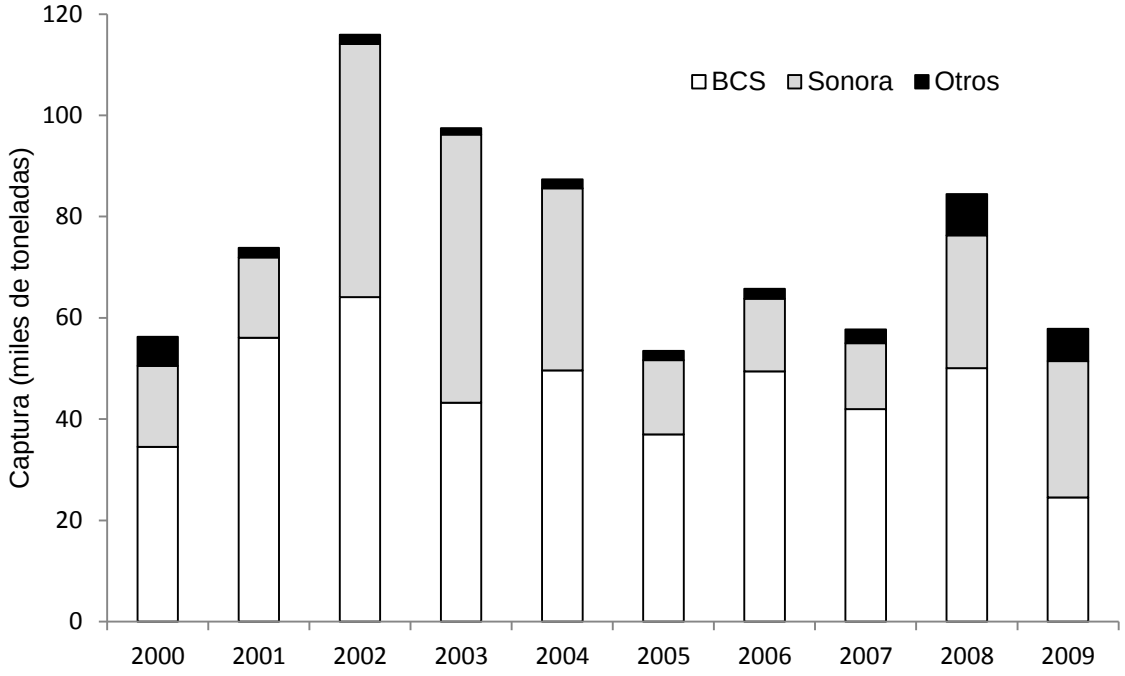

Figura 2. Serie histórica de la producción de calamar en peso vivo 2000-2009 por estados. (Conapesca, 2009).

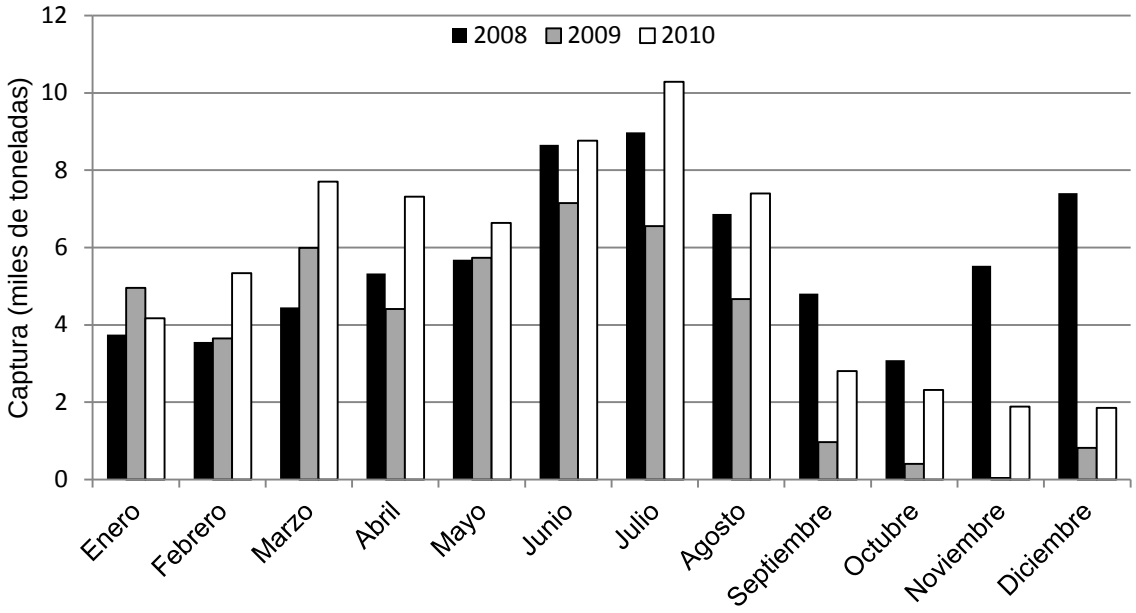

Figura 3. Volumen de la producción de calamar mensual en peso desembarcado en el 2008, 2009 y 2010. (Conapesca, 2008, 2009 y 2010).

Importancia Económica y Comercialización

El calamar es la 6ta especie con mayor volumen de captura en México, representando el 3.3 % de la captura total nacional, sólo después de especies como la sardina (49.4 %), camarón (13.1 %), atún (11.1 %) y mojarra (4.4 %). La captura de esta especie representa una importante actividad económica para los estados del Golfo, especialmente para Sonora y Baja California Sur (Conapesca, 2009).

A pesar del alto volumen de captura de calamar, los ingresos generados de su pesquería son bajos, debido a su bajo valor comercial. El calamar se encuentra en el lugar 18 de importancia económica, representando sólo el 1.2 % con respecto al total de ingresos generados por el sector pesquero a nivel nacional. Especies como el pulpo, robalo, trucha, langosta, mero, huachinango, jaiba, almeja y carpa, generan menores volúmenes de captura pero una mayor derrama económica para el sector pesquero mexicano (Conapesca, 2009).

El precio por kilo del calamar al mayoreo y menudeo en el Distrito Federal es de 14 y 21 pesos, respectivamente (Conapesca, 2009). Este valor es muy inferior al de otros mariscos como el camarón de pacotilla (109 y 150), pulpo congelado (81 y 140) y jaiba entera (34 y 41). No obstante, desde el 2005 hasta el 2009, se ha presentado un aumento sostenido en el precio del calamar (de alrededor del 60 %) (Figura 4), muy por encima del calculado mediante el índice inflacionario de cada año. Este incremento sigue una tendencia similar en la actualidad y puede estar asociado a un incremento en la demanda nacional (Luna-Raya *et al.,* 2009).

No obstante lo anterior, el calamar gigante sigue presentando un bajo valor comercial. Esto se asocia principalmente a la baja aceptabilidad y consumo en el mercado nacional de productos pesqueros, lo cual se encuentra directamente influenciado por los gustos y preferencia de los consumidores, quienes prefieren productos cárnicos de pollo, res y cerdo por encima de los productos pesqueros (Luna-Raya *et al.,* 2006). En este sentido, el consumo per cápita de calamar gigante es sólo de 0.4 kg/año (Conapesca, 2009).

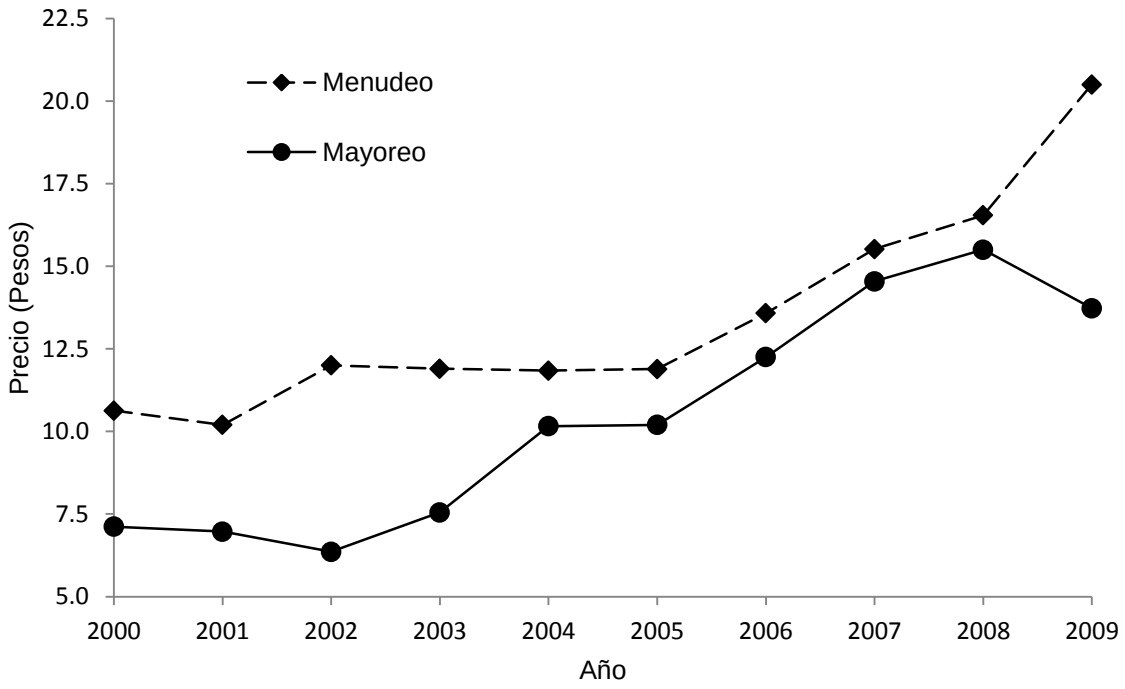

Figura 4. Serie histórica del precio al menudeo y mayoreo del calamar en el distrito federal 2000-2009 (Conapesca, 2009).

Se han identificado diferentes factores que podrían explicar el bajo consumo de calamar. Dentro de los más importantes incluyen el limitado conocimiento del producto, por un lado, porque la gente no lo conoce (23 %) y por otro lado, porque se desconoce su forma de preparación (74 % de la gente no sabe prepararlo) (Luna-Raya *et al.,* 2006), así como la presencia de compuestos relacionados al sabor ácido-amargo del músculo de calamar gigante (Sánchez-Brambila *et al.,* 2004).

De acuerdo a la disponibilidad del calamar gigante en México, el 51 y 46 % del calamar es comercializado como fresco y congelado respectivamente; mientras presentaciones como seco-salado y enlatado representan sólo el 0.31 y 0.05 % respectivamente (Conapesca, 2009). Según Luna-Raya *et al.* (2006), existe la tendencia hacia el consumo del calamar gigante en forma de productos de valor agregado, por ejemplo, empanizado, en ceviche y guisado.

Productos con Valor Agregado

Desde el punto de vista tecnológico, el músculo de calamar tiene una serie de ventajas con respecto al del pescado, como el alto rendimiento de la fracción comestible (60 %) (Cortés-Ruiz *et al.*, 2008), el bajo contenido de grasa, un sabor suave y una carne muy blanca (Park y Lin, 2005).

En los últimos años, se han realizado diversas investigaciones orientadas a la elaboración de productos con valor agregado a partir del manto, aletas y tentáculos de calamar gigante. Algunos de estos productos incluyen la elaboración de concentrados húmedos de proteínas tipo-surimi, imitación de filetes de pescado reestructurados, productos tipo gel-emulsificados e hidrolizados de proteína.

Para la elaboración de concentrados proteicos se han probado diferentes metodologías como la de disolución ácida (Cortés-Ruiz *et al.*, 2008; Palafox-Carlos, 2009; Sánchez-Alonso *et al.*, 2007), disolución neutra (Cortés-Ruiz *et al.*, 2008; Campo-Deaño 2009 y 2010) y disolución alcalina (Palafox-Carlos, 2009; Dihort-García *et al.*, 2011). El resultado ha sido que las diferentes técnicas ofrecen productos de muy buena calidad funcional (generalmente superior a la que ofrece el músculo sin procesar), ideal para la elaboración de productos gelificados, emulsificados y productos que involucre la formación de espuma. Campo-Deaño *et al.* (2010), demostraron que es posible elaborar productos de imitación a filetes de pescado fresco con características aceptables, a partir de concentrados proteicos congelados de músculo de calamar gigante.

Además, se han elaborado otros productos a partir de músculo de calamar gigante. Félix-Armenta *et al*. (2008) elaboraron un producto tipo gel-emulsificado (salchicha) encontrando gran aceptabilidad en el producto, con excelentes características de textura y mostrándose estable durante un periodo de 21 días. De La Fuente-Betancourt *et al*. (2009) quienes elaboraron hidrolizados de proteína a partir de esta especie, encontrando excelentes propiedades funcionales de espumado y emulsificación, especialmente cuando fueron elaborados usando

papaína. Cabe aclarar que las propiedades funcionales del músculo fueron de muy buena calidad, aun sin la aplicación de ningún tratamiento enzimático.

Organización Estructural y Composición del Músculo de Calamar

La porción comestible del calamar gigante está constituida por el manto, brazos y tentáculos, resultado del descabezado y eviscerado del calamar entero. Esta fracción representa aproximadamente el 60 % del peso total (Cortés-Ruiz *et al.*, 2008), valor cercano a lo reportado para otras especies de calamar como el *Illex illecebrosus* (Slabyj *et al.*, 1981). El rendimiento de la fracción comestible es mayor con respecto a la del pescado (Shaidi, 2007), debido a que el calamar es un organismo invertebrado. El manto es la parte más representativa de la fracción comestible del calamar gigante, ya que constituye del 53-56 % con respecto al peso total.

Por otro lado, se ha observado que las dimensiones y peso del manto pueden presentar grandes variaciones. Velázquez-Abunader *et al.* (2010), midieron la longitud de manto de más de 5,500 ejemplares de calamar gigante, encontrando organismos con una longitud de manto desde 16 hasta 96 cm, con tallas promedio entre 35 y 64 cm. Estas variaciones de tallas fueron observadas tanto entre temporadas de captura como interanualmente en una misma temporada. Así mismo, se han reportado organismos con peso de manto desde 0.6 kg con menos de 40 cm de longitud de manto (Ramírez-Suárez *et al.*, 2008), hasta organismo de gran tamaño con un peso de casi 10 kg de manto (Dihort-García *et al.*, 2011).

Estructura

Estructuralmente, el músculo del calamar está constituido por una capa de fibras musculares rodeada de dos capas de tejido conectivo, una interior y otra exterior (Figura 5). Las fibras musculares representan el 98 % del espesor del músculo y son de dos tipos: las fibras circunferenciales, que corren a lo largo de la circunferencia del cono del músculo, y las fibras radiales, que conectan a las dos capas de tejido conectivo. La primera capa de tejido conectivo o interna, está conformada de la capa visceral y la túnica interna, las cuales están unidas a las fibras musculares desde el interior del manto. La segunda capa de tejido conectivo o externa, la conforman la túnica externa y la capa exterior, que están unidas a la piel del manto (Otwell *et al.*, 1980). Esta organización estructural, es distintiva del músculo de calamar y difiere en gran medida a la de otras especies como la de peces o mamíferos (Matsumoto, 1979).

Todas las fibras musculares del manto de calamar son células delgadas y largas. Presentan una apariencia estriada oblicua, debido a que presentan una clara organización sarcomérica y a que las líneas Z no son perpendiculares al eje de la miofibrilla, presentando una inclinación del 6-12° en estado relajado o de 14-18° en la contracción (Ponce-Alquicira *et al*., 2009).

Composición Proximal

El músculo de calamar está constituido principalmente por agua y proteína y en menor proporción por grasa, minerales, carbohidratos y nitrógeno no proteico.

El músculo de calamar gigante es considerado de alto contenido de humedad (Gómez-Guillén *et al.*, 1997b) comparativamente al músculo de pescado (Huss *et al.*, 1998). El contenido de humedad y proteína presenta gran variación oscilando normalmente en un rango entre 80-87 % y 12-19 % respectivamente (Tabla 1),

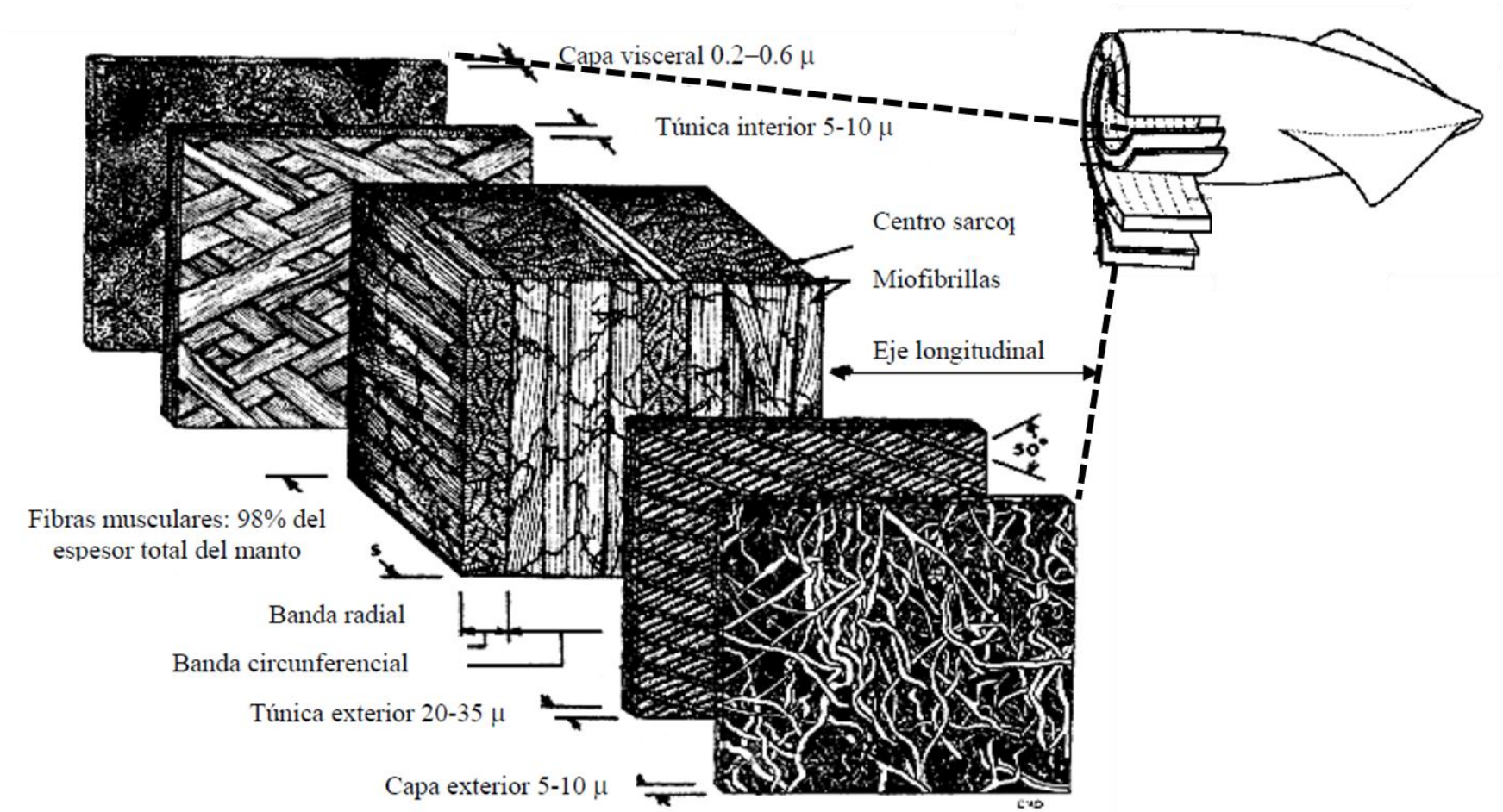

Figura 5. Representación de la estructura del músculo de calamar *Loligo pealei.* Adaptada de Otwell *et al.*, 1980.

Tabla 1. Composición química del calamar gigante

Humedad	Proteína*	Grasa	Ceniza	CHO	Zona de captura	Referencia
86.4	12.1	0.2	0.7	0.6	Golfo de California (San Carlos y Nuevo Guaymas)	[1]
86.5	12.2	0.3	0.9	0.1	Golfo de California (San Carlos y Nuevo Guaymas)	[1]
83.1	12.3	----	----	----	V Región San Antonio (Chile)	[2]
81.5	15.0	0.2	1.3	----	Golfo de California (Santa Rosalía)	[3]
86.3	12.2	0.4	0.8	0.3	Golfo de California (San Carlos y Nuevo Guaymas)	[4]
83.7	14.3	0.9	1.2	----	Golfo de California (Bahía de Kino)	[5]
79.9	19.0	1.4	1.4	----	No reportado	[6]
84.3	14.5	0.6	0.6	----	No reportado	[7]

* Proteína cruda

[1] Ramírez-Suárez *et al.*, 2008; [2] Abugoch *et al.*, 2000; [3] Fuente-Betancourt *et al.*, 2009b; [4] Félix-Armenta *et al.*, 2008; [5] Cortés-Ruiz *et al.*, 2008; [6] Gómez-Guillén *et al.*, 1997b; [7] Campo-Deaño *et al.*, 2010

aunque se ha reportado contenidos de humedad y proteína de hasta 74 % y 29 % respectivamente (Ezquerra-Brauer *et al.*, 2002), efecto atribuido a la temporada de captura (Ramírez-Suárez *et al.,* 2008).

El contenido de humedad y proteína representan casi el 98 % del peso total del músculo. Debido a esto, parece haber una correlación entre el contenido proteína cruda y el contenido de humedad, ya que en las muestras de baja humedad se puede observar un mayor contenido de proteína en comparación con las muestras de humedad alta. Esto, puede ofrecer una ventaja tecnológica, ya que podría estimarse el contenido de proteína del músculo de calamar conociendo su contenido de humedad, como una forma rápida de estimar la calidad de la materia prima para la elaboración de productos con valor agregado, sin embargo esta hipótesis debe de ser validada.

Proteínas del Músculo

Las proteínas son el componente mayoritario de la materia seca del músculo de calamar. Estas se clasifican en tres grupos: miofibrilares, sarcoplásmicas y estromales

Proteínas Miofibrilares. Las proteínas miofibrilares representan la fracción mayoritaria de las proteínas musculares, siendo solubles en soluciones de fuerza iónica intermedia (0.6-1.0 M) y tienen la función de llevar a cabo la contracción muscular (Park y Lin, 2005).

Estructuralmente, las proteínas miofibrilares se componen de un filamento grueso y uno delgado. El primero está constituido de moléculas de miosina ensambladas (Reggiani y Bottinelli, 2008) y el segundo por la F-actina, tropomiosina y complejo troponina. Dependiendo de la especie, estas proteínas presentan diferencias de estabilidad térmica (Howell *et al.*, 1990), solubilidad, estructura y mecanismo de regulación (Reggiani y Bottinelli, 2008).

La miosina es la proteína de mayor importancia y abundancia de las proteínas miofibrilares. Es un hexámero de 470 kDa, integrado por dos cadenas pesadas enrolladas de 216 kDa y dos pares de cadenas ligeras de 17 y 15 kDa cada una (Reggiani y Bottinelli, 2008). Presenta actividad enzimática Mg-ATPasa dependiente de Ca^{2+} y Sr^{2+} y su función es transformar la energía química del ATP, en energía mecánica durante la contracción (Foegeding, 2000).

La proteólisis controlada de la miosina con tripsina produce dos fragmentos llamados meromiosina pesada (MMP) y meromiosina ligera (MML) (Figura 6). La MML está constituida de dos terceras partes de la doble hélice alfa helicoidal de la miosina (Reggiani y Bottinelli, 2008). La MMP incluye la otra parte de la doble hélice alfa helicoidal unida a dos dominios globulares que son las cabezas de la miosina. La posterior hidrólisis de la MMP con papaína produce dos subfragmento S1 y un subfragmento S2 (Berg *et al.*, 2008). Cada subfragmento S1 o también llamado “dominio motor”, conserva un sitio con actividad ATPasa y un sitio de unión a la actina (Reggiani y Bottinelli, 2008).

Existen dos diferencias importantes de las proteínas miofibrilares del calamar *Illex illecebrosus* en relación al músculo de pescado. Una es la presencia de una proteína del filamento grueso llamada paramiosina, y otra es la baja proporción que representa la cadena pesada de la miosina (CPM) sobre el total de proteínas miofibrilares (Sotelo *et al.,* 2000).

La paramiosina es una proteína que no se encuentra en el músculo de animales terrestres y del pescado, sólo la poseen organismos invertebrados como el calamar. Esta proteína forma parte del filamento grueso del complejo actomiosina. Se ha reportado la presencia de paramiosina en músculo de calamar (*Illex illecebrosus*) como dos subunidades de pesos moleculares de 92 y 103 kDa, las cuales representaron el 13.3 y 5.3 % sobre el total de proteínas miofibrilares (Sotelo *et al.,* 2000). De manera similar, se ha reportado la presencia de paramiosina en músculo de calamar gigante alrededor de los 97 kDa (Cortés-Ruiz *et al.*, 2008; Ramírez-Suárez *et al.*, 2008) y 111 kDa (De La Fuente-Betancourt *et*

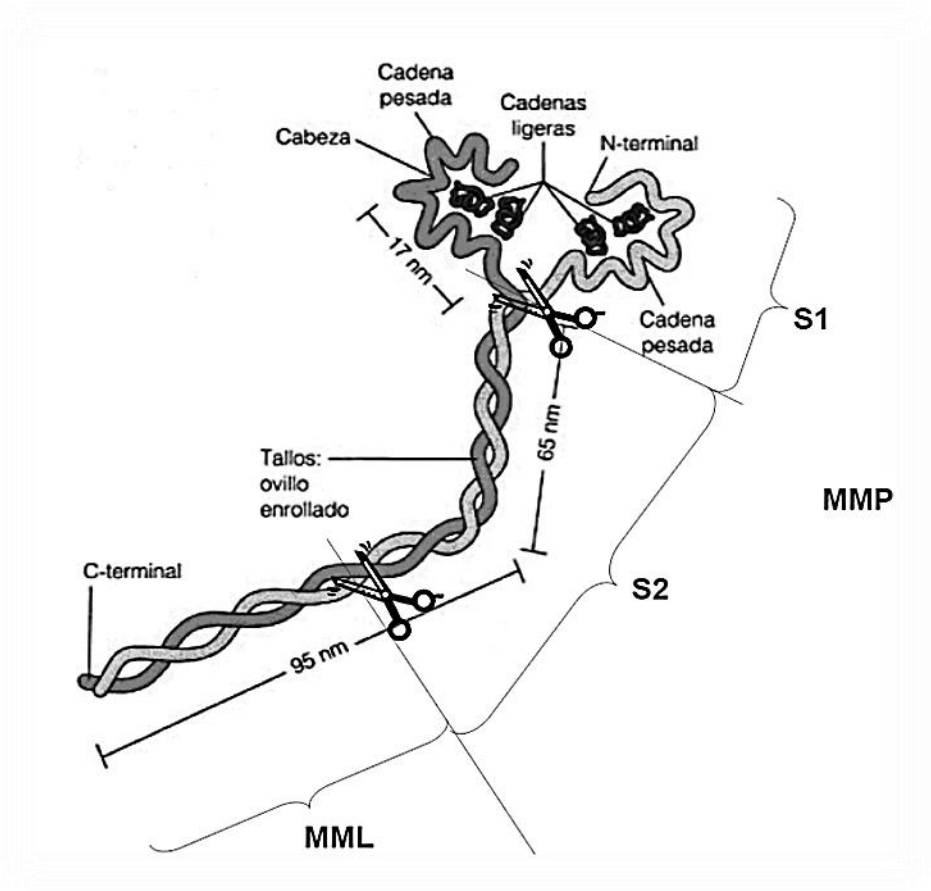

Figura 6. Representación esquemática de la miosina. MML: Meromiosina ligera; MMP: Meromiosina pesada; S1 y S2: Subfragmento 1 y 2.

al., 2008). Las dos subunidades de la paramiosina son cadenas helicoidales que constituye el corazón del filamento grueso con la función es estabilizar la orientación de la cadena de la miosina (Epstein *et al.*, 1985).

Sotelo *et al.* (2000) reportaron que la CPM del músculo de calamar representa sólo el 18.5 % sobre el total de proteínas miofibrilares, mientras que en otras especies de pescado como el *M. gayi, M. australis* y *Merluccius merluccius,* esta proteína representa alrededor del 50 %. Los autores atribuyen esta diferencia a la presencia de paramiosina y a la actividad autolítica del músculo de calamar que provoca la gradual desaparición de la CPM y la aparición de proteínas de menor peso molecular (190, 152 y 100 kDa).

En el mismo estudio, se calculó el peso molecular y la proporción sobre el total de proteínas miofibrilares de otras proteínas del músculo de calamar, como la actina de 44.8 KDa (37.3 %) y fragmentos de 166 kDa (3.2 %), 28.6 kDa (13.1 %), 20.4 kDa (3.2 %) y 16.5 kDa (4.4 %), que pueden ser proteínas reguladoras y productos de degradación de la CPM.

Proteínas Sarcoplásmicas. Estas proteínas son solubles en soluciones salinas de baja fuerza iónica (0.05 M) y son responsables de la actividad enzimática, osmoregulación y transporte (Huss *et al.*, 1998). La proporción de estas proteínas con respecto al total de proteínas en el pescado puede variar entre 18-25 % (Lanier *et al*., 2005).

Proteínas Estromales. Las proteínas estromales o del tejido conectivo son insolubles en agua, constituidas principalmente por colágeno, proteínas de membrana y contráctiles insolubles (Lanier *et al.*, 2005).

El manto de calamar gigante está constituido por un 7.7 % de tejido conectivo, muy por encima del contenido de tejido conectivo del músculo de pescado (Lanier *et al.*, 2005). Incluso, la cantidad de tejido conectivo puede ser mayor en las aletas (12.7 %) o tentáculos (28.3 %) del calamar gigante (Torres-Arreola *et al.,* 2008). En otras especies de calamar la cantidad de tejido conectivo puede oscilar entre 3-18 % (Sikorski y Borderías, 1994; Morales *et al.*, 2000).

Torres-Arreola *et al*. (2008) reportaron que el colágeno extraído del manto de calamar gigante es principalmente soluble en sal (40 %) y pepsina (40 %), mientras que el restante (20 %) representa al colágeno insoluble. Este autor explica que el colágeno es principalmente soluble en sal ya que las subunidades de colágeno no se encuentran unidas covalentemente a otras cadenas de colágeno debido a la alta tasa de recambio proteico (Sikorski y Borderías, 1994; Morales *et al*., 2000).

Propiedades Funcionales del Músculo

Por propiedades funcionales se refiere a todas aquellas propiedades físicas y químicas que influencian el comportamiento de los alimentos durante el procesamiento, almacenamiento, preparación y consumo (Damodaran *et al*., 2008). Las propiedades funcionales más importantes de las proteínas musculares son: solubilidad, viscosidad, capacidad emulsificante y capacidad gelificante. La funcionalidad depende de factores asociados a la estructura y composición de las proteínas (intrínsecos), así como de factores del medio (extrínsecos) como pH, fuerza iónica, presencia de solutos, entre otros.

La funcionalidad de las proteínas musculares se atribuye principalmente a la miosina (Boyer *et al*., 1996). Esta proteína puede interactuar con otras proteínas o componentes del músculo a través de sus grupos reactivos, los cuales son expuestos cuando la miosina es extraída y desdoblada en su forma monomérica (Lanier *et al*., 2005). La extracción generalmente se logra por la adición de sal y fosfatos, lo que incrementa la fuerza iónica a valores cercanos a 0.6 M. Esto, aunado a la aplicación de trabajo mecánico, resulta en la liberación de las cadenas pesadas de miosina (CPM) (Cortés-Ruiz y Pacheco-Aguilar, 2009). Las interacciones de los grupos reactivos estabilizan los sistemas formados y confieren nuevas propiedades organolépticas (Lanier *et al*., 2005).

Capacidad Gelificante

Un gel es un sistema semisólido de viscosidad alta, formado por la asociación de macromoléculas dispersas en solución y/o suspensión mediante interacciones intermoleculares (Sikorski, 2001). La gelificación puede inducirse por métodos físicos como químicos. Los físicos incluyen la gelificación inducida por calor y presión, mientras que los químicos incluyen la gelificación por iones, urea, ácida y enzimática (Totosaus *et al*., 2002). Cada uno de estos puede llevarse a cabo de

manera independiente o en combinación (Lanier *et al*., 2005). En este escrito, nos enfocaremos únicamente a la gelificación térmica.

Proceso de Gelificación Térmica. El proceso de gelificación se puede resumir en tres pasos: 1) extracción, 2) desnaturalización y agregación y 3) estabilización.

EXTRACCIÓN: Ya que las proteínas miofibrilares son las principales involucradas en la gelificación del músculo, el proceso de gelificación inicia con su extracción. Esto se logra mediante la adición de sal para elevar la fuerza iónica y de esta forma solubilizar y/o suspender a las proteínas miofibrilares (Lanier *et al.*, 2005). El incremento de la fuerza iónica también promueve el desdoblamiento de la miosina y la exposición de superficies reactivas (Howell *et al.,* 1991). No obstante, en ciertos casos la gelificación se puede lograr sin la adición de sal (Sun y Holley, 2011).

DESNATURALIZACIÓN Y AGREGACIÓN: La elevación de la temperatura por encima de la temperatura de desnaturalización de las proteínas musculares, conduce a la exposición de grupos reactivos cuya interacción promueve la agregación irreversible de la cabeza de la miosina a través de puentes disulfuro y transiciones hélice-cola de la molécula, resultando en el entrecruzamiento de las proteínas (Sun y Holley, 2011). Las interacciones que intervienen principalmente en la estabilización del gel son las interacciones hidrofóbicas. No obstante, la formación de puentes disulfuro, puentes de hidrógeno e interacciones iónicas tienen un efecto importante en las características de calidad del gel (Lanier *et al.*, 2005).

ESTABILIZACIÓN: Posterior al calentamiento, la reducción de la temperatura del gel a temperaturas de refrigeración promueve la formación de puentes de hidrógeno. Esto, puede incrementar la fuerza de gel y capacidad de retención de agua (Lanier *et al.*, 2005).

Durante el proceso de gelificación se pueden presentar fenómenos que pueden afectar positiva o negativamente a la calidad de gel. Dos fenómenos muy estudiados en el músculo del pescado son el *setting* (ó *suwari) y* el *modori*

(ablandamiento). Cada una de estos fenómenos se llevan a cabo a diferentes temperaturas y su intensidad, incluso su aparición, puede variar de una especie a otra (Lanier *et al.*, 2005).

El *setting* se puede presentar entre los 0-40 °C como resultado de la polimerización de la CPM a través de la enzima endógena transglutaminasa (TG) Ca^{2+}-dependiente (Mahawanich *et al.*, 2010). Esto se da por medio de la formación de enlaces cruzados entre los aminoácidos glutamina y el grupo ε-amino de lisina de cadenas vecinas (Lanier *et al.*, 2005). La adición de TG de origen microbiano se ha utilizado en numerosos estudios como inductor del *setting* (Buchert *et al.*, 2010; Castro-Briones *et al.*, 2009). Así mismo, existen estudios que indican que durante el *setting* se da la formación de interacciones hidrofóbicas debido al desplegamiento de la α-hélice de la cadena pesada de la miosina (Lanier *et al.*, 2005). La adición de crioprotectores puede también mejorar las características de textura de geles durante el *setting* debido a la formación de puentes de hidrógeno.

El *modori* es un fenómeno indeseable que ocurre principalmente por la acción de enzimas proteolíticas endógenas presentes en el músculo de pescado. El intervalo de temperatura de mayor actividad y la intensidad depende de la especie. En músculo de tilapia roja (*O. niloticus* y *O. placidus*), el *modori* se presenta a una temperatura aproximada de 65 °C, lo que provoca la reducción de la fuerza de gel (ablandamiento) de surimi hecho a partir del músculo y se correlaciona con el incremento de la actividad del extracto crudo de proteasas entre los 45-65 °C (Mahawanich *et al.*, 2010). Por otro lado, el *modori* también puede ser resultado de la coagulación masiva vía interacciones proteína-proteína y de la interacción con proteínas globulares no enzimáticas, lo que previene la formación de una estructura fibrilar ordenada (Álvarez *et al.*, 1999).

<u>Factores que Afectan la Gelificación.</u> La capacidad gelificante es una propiedad muy sensible que es influida por varios factores, como la concentración de proteína (o humedad), proteólisis, temperatura, setting a baja temperatura, uso de ingredientes funcionales, desnaturalización, abuso de congelación, entre otros

(Lanier *et al.*, 2005). Estos factores modifican las interacciones intermoleculares que estabilizan al gel provocando cambios en sus características de textura.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA. La capacidad gelificante de las proteínas generalmente se ve incrementada cuando el contenido neto de proteína aumenta (Sun y Holley, 2011). Brewer *et al.* (2005) evaluaron los geles térmicos hechos a partir de diferentes concentraciones de proteínas miofibrilares de res a través de su perfil de textura. Estos autores reportan un incremento de la dureza de gel con el incremento de la concentración de proteína en un rango de 6-12 %. La cohesividad y elasticidad de los geles también incrementó conforme aumentó la concentración de proteína pero de manera menos consistente. Estos autores concluyen que el incremento de la dureza fue causado por un aumento de la densidad de proteína en la matriz del gel, lo que a su vez puede incrementar el potencial de enlaces cruzados e interacciones.

pH. Las propiedades de gel de las proteínas miofibrilares dependen directamente del pH. El pH tiene un fuerte efecto en el tipo de interacciones que estabilizan los geles proteicos (Sun y Holley, 2011). A medida que el pH se acerca al punto isoeléctrico (*pI*) de las proteínas, se favorecen las interacciones proteína-proteína y los espacios entre cadenas proteicas se ven reducidos, formándose una red proteica compacta con pocos espacios abiertos. A este pH, la carga neta de las proteínas es aproximadamente cero y las cadenas proteicas se ven fuertemente atraídas, principalmente por interacciones hidrofóbicas, predominando las interacciones proteína-proteína sobre las interacciones proteína-agua, lo que resulta en una baja capacidad de retención de agua. El proceso de gelificación en el *pI* resulta en geles de pobre calidad o incluso, puede inhibirse la formación del gel (Smith, 2001).

El pH parece influenciar fuertemente la estructura secundaria de las proteínas miofibrilares. Liu *et al.* (2008) evaluaron mediante dicroísmo circular (DC) los cambios en la estructura secundaria de la miosina de cerdo asociado al pH. Estos autores observaron la reducción de la proporción de α-hélice de 87.4 a un 15.8 % e incrementos de hojas-β de 5.1 a 41.2 % desde pH 7 a 5.5 a 15 °C. Esto, aunado

a sus resultados de microscopia electrónica de barrido de los geles, sugiere que mantener el pH cercano al punto isoeléctrico provoca la coagulación prematura de la miosina a baja temperatura. Los autores encontraron correlaciones muy fuertes entre la estructura secundaria de la miosina y las propiedades de gel, lo que indica que el desdoblamiento de las α-hélice y la formación de hojas-β juegan un rol importante en la gelificación.

Si el pH del gel se aleja del *pI,* la red proteica se abre por repulsión de cargas, dejando espacios más amplios entre cadenas de proteína. La formación de una carga neta puede ayudar a mejorar las interacciones proteína-agua. Sin embargo, si el pH de las proteínas está muy alejado del *pI*, las interacciones proteína-proteína se debilitan formándose una red proteica abierta con pobre capacidad gelificante (Sun y Holley, 2011).

El pH óptimo de gelificación del músculo de pollo, res y surimi es alrededor de 6 (Sun y Holley, 2011). A este pH las interacciones proteína-proteína y proteína-agua están equilibradas. Esto se confirma en varios reportes, donde se ha indicado que el pH óptimo para la formación de geles de miosina de res, y actomiosina de calamar es alrededor de 6 a baja concentración de sal (0.1-0.3 M NaCl) (Hermansson *et al.*, 1986; Paredi *et al.*, 1999).

OTROS FACTORES. Existen otros factores importantes que influyen en la capacidad gelificante. Entre ellos se encuentra la especie, tipo de músculo, velocidad y temperatura de calentamiento durante la gelificación, fuerza iónica, aplicación de presión, presencia de gelatina y grasa, adición de aditivos (transglutaminasa, aditivos proteicos y no-proteicos), oxidación de proteínas, entre otros (Sun y Holley, 2011; Totosaus *et al.*, 2002).

Congelación y Almacenamiento en Congelación

La congelación es uno de los métodos más antiguos y utilizados para la conservación de los alimentos (Evans, 2008). La principal ventaja de este método es el considerable incremento de la vida de anaquel del producto, debido a la desaceleración de las reacciones de autólisis y deterioro microbiológico (Park, 1994). Sin embargo, los alimentos congelados no se encuentran en estado de equilibrio (Nesvadba, 2008), por lo que la congelación puede promover cambios indeseables en la calidad final de los alimentos sensorial, nutricional y funcionalmente (Evans, 2008). Los principales cambios involucrados en la reducción de la calidad se deben a cambios físicos y químicos, como reacciones enzimáticas, desnaturalización-agregación de proteínas, oxidación lipídica, degradación de pigmentos y deterioración del sabor, entre otros (Zaritzky, 2008).

Debido a su impacto tecnológico, en esta sección sólo nos enfocaremos al efecto de la congelación sobre las propiedades funcionales de las proteínas musculares.

Proceso de Congelación

Para entender cómo afecta la congelación a las propiedades funcionales, es necesario entender la dinámica de la transformación de agua en hielo durante el proceso de congelación. Así pues, para ejemplificar lo que ocurre en el músculo, se muestra el proceso de congelación de una solución binaria (S) (agua más un soluto puro) comparativamente al agua pura (W) (Figura 7). Esta curva aplica para una muestra pequeña, removiendo el calor a una velocidad lenta y constante.

Enfriamiento. Cuando una solución o el agua pura se enfría iniciando a una temperatura por encima del punto de congelación (A), se da un decremento lineal de la temperatura con respecto al tiempo. Cuando la temperatura del agua llega al punto de congelación (que en el caso del agua pura es de 0 °C), esta no se

convierte en hielo inmediatamente, sino que es necesario el subenfriamiento (B ó B') para que ocurra la nucleación.

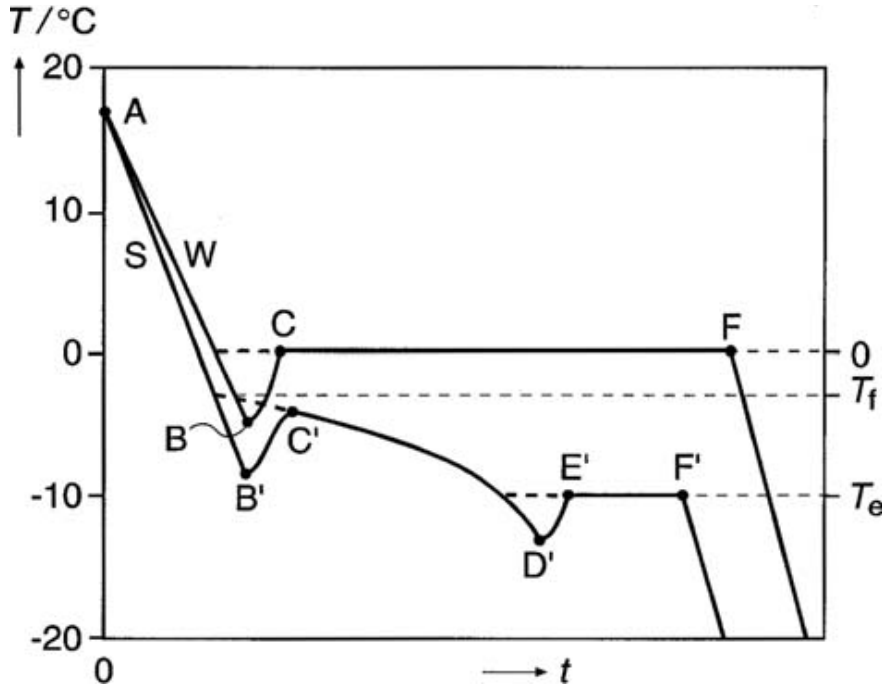

Figura 7. Ejemplo de curva de enfriamiento del agua (W) y de una solución acuosa (S). La tasa de remoción de calor es constante (J X kg^{-1} X s^{-1}). *T* es la temperatura y *t* es el tiempo. T_e y T_f son las temperaturas eutécticas y de inicio de la congelación de la solución, respectivamente. Fuente: Walstra (2002).

Nucleación. La transición B-C (ó B'-C') implica la formación de cristales de hielo ó nucleación, proceso exotérmico que provoca un incremento de temperatura hasta la temperatura de congelación. La nucleación es el comienzo de la congelación e involucra la presencia o formación de pequeños núcleos que son los centros de los cristales que se forman.

Formación y Crecimiento de Cristales. La transición C-F implica la remoción del calor necesario para llevar a cabo el cambio de fase de agua a hielo (calor latente), que en el agua pura es de 334 J/g. Esta etapa es a temperatura constante en el agua pura. Una vez que toda el agua es convertida a hielo

(posterior a F), la remoción de calor es proporcional al decremento de la temperatura.

En el caso de sistemas binarios (S), la curva de enfriamiento presenta 3 diferencias principales: 1) la temperatura de congelación y subenfriamiento son menores a las del agua pura, 2) la formación de cristales de hielo no es a temperatura constante y 3) se presenta una transición de subenfriamiento y cristalización del soluto.

Las diferencias 1 y 2 se deben a que el agua disminuye su punto de congelación cuando un soluto está presente. Por esa razón el punto de congelación de S es menor al de W. En este sentido, cuando la solución es subenfriada y comienza a cristalizar (B'), y después llega a su temperatura de congelación (C'), la temperatura de congelación disminuye conforme se forma hielo, debido a la concentración del soluto en el agua no-congelada remanente. Esto ocurre hasta que la solución llega a la temperatura de subenfriamiento (D') y cristalización (E') del soluto. La transición (E'-F') implica el proceso de cristalización del soluto a temperatura constante (temperatura eutéctica).

En el músculo, el comportamiento térmico durante la congelación mostrado anteriormente es mucho más complejo debido a la presencia de múltiples solutos y de materia con propiedades particulares (Walstra, 2002).

Recristalización. Se refiere al incremento del tamaño medio de los cristales de hielo y simultánea reducción numérica durante el almacenamiento (Fennema, 2000). El crecimiento de los cristales de hielo de mayor tamaño a expensas de los de menor tamaño es un fenómeno espontáneo que ocurre durante la congelación y se conoce como “Maduración de Ostwald” (Nesvadba, 2008; Walstra, 2003; Fennema, 2000). La velocidad de recristalización depende de varios factores como la temperatura de almacenamiento, fluctuaciones de temperatura, presencia de solutos, velocidad de congelación, entre otros.

En el músculo, conforme transcurre el almacenamiento la recristalización provoca la migración gradual del agua extracelular y principalmente del agua intracelular,

hacia la superficie de los cristales de hielo provocando su crecimiento. Esto deriva en la reducción parcial del agua no-congelada de los espacios intermiofibrilares de las células musculares. Dado que los miofilamentos se encuentran dispersos en el agua no-congelada, la disminución de ésta provoca que los miofilamentos se compacten, favoreciendo el entrecruzamiento y la agregación (Llorca *et al.*, 2001).

Mecanismo de la Desnaturalización-Agregación Proteica

A través del tiempo se han propuesto varios mecanismos que expliquen los cambios estructurales y funcionales de las proteínas debido a la congelación. A continuación se muestran los más importantes.

Desestabilización por Frío. La desestabilización de las fuerzas intramoleculares puede modificar la estructura terciaria de las proteínas. Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas intramoleculares de mayor importancia para el mantenimiento de la estructura nativa de proteínas globulares (como la cabeza de la miosina) (Lanier *et al.*, 2005). Interacciones intramoleculares como puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Walls, también contribuyen a la estabilidad de las proteínas globulares, pero en menor medida que las interacciones hidrofóbicas (Park, 1994). Cuando disminuye la temperatura del alimento la fuerza de las interacciones hidrofóbicas se debilita, debido a que las moléculas de agua interfieren con estas. Hipotéticamente, esto puede producir disociación oligomérica, rearreglo de subunidades dentro de oligómeros, cambios de conformación y agregación (Fennema, 2000).

Por otro lado, en el caso de proteínas helicoidales (como la cola de la miosina) los puentes de hidrógeno son las principales fuerzas intramoleculares que estabilizan a la proteína, mientras que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel secundario ya que sólo el 25 % de los aminoácidos tienen cadenas laterales hidrofóbicas (Lanier *et al.*, 2005). Por lo que este tipo de proteínas pueden llegar a ser más estables en congelación que las proteínas globulares.

No obstante, Lanier *et al.* (2005) exponen que generalmente los cambios indeseables que acompaña la preservación por congelación usualmente no se atribuyen a la reducción de temperatura por debajo de los 0 °C, sino principalmente a la transición líquido-sólido del agua (Strambini y Gabellieri, 1996).

Concentración de Solutos. La modificación de las interacciones agua-soluto que ocurren durante la congelación puede explicarse a partir de la dependencia que existe entre la proporción de agua no-congelada en los alimentos y la temperatura de almacenamiento. Cuando se reduce la temperatura de los alimentos al punto de congelación, y se continúa eliminando calor (latente), el porcentaje de agua no-congelada disminuye, trayendo como resultado un incremento de la concentración de solutos disueltos (minerales y compuestos orgánicos solubles), disminuyendo la temperatura de congelación de la solución (Fennema, 2000).

El contenido de agua no-congelada del músculo de merluza disminuye de 90 al 44 % al bajar la temperatura de -1 a -2 °C y es de solamente el 20 % a -5 °C (Park, 1994). Kolbe (2005) muestra que la cantidad de agua no congelada en el surimi puede variar desde un 100 % por encima de -1.5 °C (punto de congelación) hasta aproximadamente un 28 % a -7 °C.

Cuando el pescado se almacena en congelación (de -10 °C a -20 °C), el contenido de agua no-congelada es aproximadamente del 10 %, lo que puede provocar el aumento de la concentración de solutos y la fuerza iónica del agua no-congelada. Bajo estas condiciones, las proteínas se pueden desnaturalizar y agregar por efecto de las sales sobre las interacciones intramoleculares no covalentes (salting out) que estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria (Park, 1994). Kang *et al.* (2008) encontraron que la sal residual tiene un efecto negativo en la calidad de surimi congelado, especialmente cuando los niveles de sal residual durante la congelación fueron mayores a 0.8 %.

Formación de Interacciones Intermoleculares. Para que las proteínas puedan desarrollar propiedades funcionales, es necesario que haya disponibilidad de formación de interacciones intermoleculares y presencia de grupos reactivos que

favorezcan la interacción de las proteínas con otras proteínas, agua y lípidos del medio. Algunos de los grupos reactivos más importantes para el desarrollo de las propiedades funcionales incluyen las cadenas laterales hidrofóbicas de los aminoácidos, grupos sulfhidrilos, puentes de hidrógeno y grupos iónicos (Lanier *et al.*, 2005). Durante la congelación, la proporción y disponibilidad de estos grupos reactivos se modifica, lo cual tiene un efecto sobre la funcionalidad.

Pérez-Mateos *et al.* (1997) encontraron que la aplicación de diferentes tratamientos físicos (presión y temperatura) para lograr la gelificación del músculo de bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), tiene un efecto sobre el tipo de interacciones intermoleculares que estabilizan el gel, lo que a su vez se correlaciona con el perfil de textura.

Benjakul *et al.* (2003) y Thanonkaew *et al.* (2006) reportaron que durante el almacenamiento en congelación y la aplicación de ciclos de congelación-descongelación se presenta un decremento en la cantidad de grupos sulfhidrilos y un incremento de enlaces disulfuro en las proteínas de músculo de cuatro especies de pescado y sepia. Esto sugiere que la congelación induce reacciones de intercambios sulfhidrilos-disulfuro que provocan el entrecruzamiento y agregación proteica, reduciendo con ello la solubilidad en sal del músculo. La reducción de grupos sulfhidrilos puede tener un impacto sobre las propiedades gelificantes del músculo, dado que este tipo de interacciones confieren firmeza y elasticidad a los geles térmicos elaborados (Lanier *et al.*, 2005).

Durante la congelación puede ocurrir la desnaturalización y exposición de grupos hidrofóbicos del interior de las proteínas. Aunado a lo anterior, un almacenamiento prolongado y abuso de ciclos de congelación-descongelación, puede provocar que estos grupos hidrofóbicos interaccionen y agreguen irreversiblemente. Las interacciones hidrofóbicas son muy importantes para el desarrollo de propiedades funcionales como gelificación, emulsificación y formación de espuma (Damodaran *et al.*, 2008; Lanier *et al.*, 2005).

Factores que Afectan a las Proteínas Durante la Congelación

Las proteínas pueden verse afectadas durante la congelación y almacenamiento dependiendo de factores intrínsecos (dependientes de la especie) y extrínsecos (dependientes de las condiciones de almacenamiento).

Factores Intrínsecos. Existen diversos factores inherentes a la especie que pueden tener un efecto sobre la estabilidad de las proteínas musculares durante la congelación. Algunos de estos pueden ser la temperatura del hábitat, presencia de óxido de trimetilamina (OTMA), oxidación de lípidos, pH, entre otros (Magnussen *et al.*, 2008; Lanier *et al.*, 2005).

TEMPERATURA DEL HÁBITAT. Howell *et al.* (1991) utilizando calorimetría diferencial de barrido (CDB) encontraron que la estabilidad térmica de las proteínas miofibrilares del músculo de peces de aguas frías fue 11 °C menor que en el músculo de peces de aguas tropicales; adicionalmente mencionan que las diferencias observadas en las características térmicas de la miosina de las distintas especies, coinciden con una acelerada deterioración del músculo de peces de aguas frías durante el almacenamiento en congelación y refrigeración. Davies *et al.* (1994) reportaron que existe una correlación positiva entre la temperatura del hábitat y la T_{max} de la miosina. Rodger *et al.* (1987) exponen que los peces de aguas frías poseen proteínas adaptadas al frío para sobrevivir eficientemente en estos ambientes. Estas proteínas requieren de mayor libertad conformacional a temperaturas bajas, lo que resulta en mayor flexibilidad molecular, pero a su vez, menor estabilidad térmica durante la congelación.

PRESENCIA DE OTMA. El óxido de trimetilamina (OTMA) es un compuesto que se encuentra naturalmente en tejidos de organismos marinos, encontrándose en mayores cantidades en diferentes especies de elasmobranquios y calamares con respecto al pescado, donde se cree que actúa como osmoregulador (Huss *et al.*, 1998) y/o para contrarrestar el efecto desnaturalizante de la urea, usualmente presente en altas concentraciones en tiburones y rayas. Así mismo, se ha postulado que este compuesto puede actuar como un “anticongelante” natural. Sin

embargo, durante la congelación el OTMA se descompone en dimetilamina (DMA) y formaldehido (FA) en cantidades equimolares por medio de la enzima trimetilamina-N-oxido demetilasa (OTMA demetilasa) (EC 4.1.2.32) (Lanier *et al.*, 2005).

La presencia de FA está asociado a la formación de enlaces cruzados entre proteínas, desnaturalización y cambios en la estructura secundaria de la miosina (Careche y Li-Chan, 1997; Torrejón *et al.*, 1999). Esto, tiene un efecto negativo en la funcionalidad de las proteínas, especialmente en términos de solubilidad, capacidad gelificante y viscosidad (Careche y Li-Chan, 1997; Torrejón *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 2002). En diversos estudios, se ha logrado reducir la producción de FA durante la congelación mediante la utilización de diferentes compuestos que actúan como inhibidores de la OTMA demetilasa (Leelapongwattana *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 1999).

OXIDACIÓN DE LÍPIDOS. Durante el almacenamiento en congelación la oxidación de lípidos puede provocar la prematura desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares. Si esto ocurre, se puede reducir la capacidad gelificante y funcionalidad del músculo (Thanonkaew *et al.*, 2006; Lanier *et al.*, 2005). En músculos magros, como el de ciertas especies de pescado y calamares, la oxidación lipídica se puede presentar principalmente en los fosfolípidos de membrana (Lanier *et al.*, 2005; Atayeter y Ercoşkun, 2011). Compuestos como el ion fierro y cobre, presente en la mioglobina, hemoglobina y como cofactores de enzimas, pueden acelerar la oxidación de los lípidos durante la congelación (Thanonkaew *et al.*, 2006).

pH. El pH tiene un efecto muy importante sobre el grado de desnaturalización de las proteínas durante la congelación. A medida que las proteínas del músculo son almacenadas a un pH más cercano a su punto isoeléctrico, la desnaturalización de las mismas se ve incrementada. Este factor es de suma importancia para especies de músculo oscuro, debido a que estas poseen una alta actividad glicolítica de manera intrínseca, reflejándose en descensos de pH durante su almacenamiento en congelación (Carvajal *et al.*, 2005).

OTROS FACTORES. Adicionalmente, la presencia de osmolitos y de "*proteínas anticongelantes*" (naturalmente presentes en peces de agua frías) pueden impactar la estabilidad proteica durante la congelación. Estos dos componentes tienen un principio diferente de acción. Mientras los osmolitos (i.e. como los crioprotectores) aumentan la viscosidad del agua no-congelada (debido a la reducción de la movilidad molecular del agua), desaceleran la formación y crecimiento de cristales y promover la hidratación de la superficie de las proteínas (incrementando la cantidad de grupos hidrofílicos) (Park, 1994), las "*proteínas anticongelantes",* se adhieren a la superficie de los cristales de hielo impidiendo su crecimiento. La diferencia entre los osmolitos y las *proteínas anticongelantes* es que mientras los primeros reducen el punto de congelación de manera coligativa, las segundas lo hacen de manera no-coligativa (Carvajal *et al.*, 2005).

Factores Extrínsecos. Los factores extrínsecos más importantes que influyen en la calidad de las proteínas del pescado durante la congelación son: número de ciclos congelación-descongelación, velocidad de congelación y descongelación, temperatura y sus fluctuaciones durante el almacenamiento, tiempo de congelación y condición de la materia prima durante la congelación. Cada uno de estos factores tiene un efecto sobre la concentración de solutos, formación de cristales de hielo durante la congelación, recristalización durante el almacenamiento, deshidratación de superficie y formación de interacciones intermoleculares (Lanier *et al.*, 2005; Park, 1994; Fennema, 2000).

CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN. El abuso de los ciclos congelación-descongelación puede tener un efecto negativo sobre la funcionalidad de las proteínas del músculo. Kim *et al.* (2005) mencionan que la capacidad gelificante de surimi de pescado (abadejo de Alaska), disminuye gradualmente cuando es sometido a 0, 3, 9 y 15 ciclos congelación-descongelación. Sin embargo, cuando surimi de superior calidad es sometido a este tratamiento, los cambios se ven en los 3 primeros ciclos. En otros estudios se ha reportado la disminución de la solubilidad de las proteínas e incremento de la pérdida por

exudado del músculo de bacalao (Benjakul y Bauer, 2000) y sepia (Thanonkaew *et al.*, 2006).

Estructuralmente, después de cada ciclo congelación-descongelación, se da un incremento en la proporción de grupos hidrofóbicos en la superficie de las proteínas, lo cual puede provocar su interacción y agregación. Este incremento en la hidrofobicidad de superficie se debe a la desestabilización de las interacciones intermoleculares, al efecto de los solutos durante la congelación y a la deshidratación de las superficie de las proteínas (Park, 1994).

VELOCIDAD DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN. Es bien sabido que la velocidad de congelación tiene un efecto importante en el número, tamaño y distribución de los cristales formados durante la congelación (Carvajal *et al.*, 2005; Nesvada *et al.*, 2008).

Cuando la congelación es rápida, se da la formación de numerosos cristales de menor tamaño en comparación a los generados durante la congelación lenta. Estos cristales se distribuyen uniformemente en el interior y exterior de la célula y causan menor daño a las proteínas y tejidos, disminuyendo la desnaturalización y agregación. En contraste, la congelación lenta genera cristales de hielo en menor cantidad pero de mayor tamaño, lo que implica mayor daño estructural a las proteínas y tejidos. Estos cristales se forman principalmente en el exterior de la célula, provocando una mayor concentración de solutos en el exterior de la misma con respecto al interior, lo que provoca la subsecuente migración de agua por difusión (Nesvadba, 2008).

Gómez-Guillén *et al.* (1997) demostraron mediante microscopia electrónica de barrido (MEB) diferencias estructurales de geles en sardina, cuando el músculo molido fue sometido a diferentes velocidades de congelación (-18 y -40 °C). La MEB reveló que la congelación lenta (-18 °C) provocó la formación de grandes agregados con cavidades de mayor tamaño en comparación a la congelación rápida (-40 °C), donde se observó una matriz ordenada y con poros pequeños. Los autores asocian este efecto a una menor agregación proteica debido a la

formación de cristales de hielo de menor tamaño formados durante la congelación rápida.

La velocidad de descongelación influye en la pérdida de humedad y consecuente disminución de rendimiento. Se han estudiado diversos métodos para llevar a cabo la descongelación de los productos pesqueros, los cuales se fundamentan principalmente en el manejo de la velocidad de descongelación. Conforme el tiempo de descongelación es mayor, el líquido extracelular formado a partir de agua intracelular puede ser reabsorbido eficientemente por las células, de manera que la pérdida de líquido es inversamente proporcional al aumento del tiempo de descongelación (Mandigo y Osburn, 1996). La reabsorción del líquido implica la reducción de la desecación de los tejidos y de la superficie de proteínas.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO. La recristalización es un fenómeno dependiente de la temperatura. A temperaturas cercanas al punto de congelación (mayores a -10 °C), la movilidad molecular es más alta en relación a temperaturas menores. Esto provoca que la recristalización ocurra de manera más rápida. Conforme disminuye la temperatura de almacenamiento, la movilidad molecular se ve reducida y la recristalización desacelerada. La temperatura de transición vítrea (Tg'), es aquella donde la fase no-congelada se supersatura y la movilidad molecular se reduce al mínimo, convirtiéndose en “vidrio” que rodea a los cristales de hielo (Fennema, 2000). Esto provoca que los fenómenos dependientes de la difusión, como la recristalización, sean prácticamente anulados.

El enfriar y mantener los alimentos por debajo de su Tg' generalmente implica costos muy elevados, lo que convierte a este tipo de conservación inviable comercialmente. Sin embargo, conforme la temperatura de almacenamiento se aproxima a la Tg', la recristalización es más lenta y por lo tanto el daño por congelación es menor. Por esa razón, numerosos estudios se han enfocado a la utilización de aditivos que incrementen la Tg' de los alimentos (crioprotectores), como los azúcares, dextrinas, sales, entre otros (Carvajal *et al.*, 2005; Evans, 2008).

FLUCTUACIONES DE TEMPERATURA. Las fluctuaciones de temperatura pueden afectar la calidad de las proteínas debido a la recristalización. Esto se debe a que se generan gradientes de temperatura entre el interior y exterior del músculo, debido a las diferencias de temperatura entre el ambiente y la superficie del músculo. Esto favorece la difusión de agua no-congelada y de agua de la superficie de los cristales pequeños, hacia la superficie de los cristales de hielo más grandes. Incluso a temperatura constante, ocurre el incremento de la fracción de hielo durante el almacenamiento en congelación debido a la movilidad molecular del agua (Nesvadba, 2008).

TIEMPO DE CONGELACIÓN. El tiempo de congelación es un factor importante que determina la calidad de las proteínas. Generalmente propiedades funcionales dependientes de la hidratación, como solubilidad, viscosidad y capacidad de retención de agua se ven afectadas negativamente durante la congelación (Mignino *et al.*, 2008; Badii y Howell, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Makri, 2009), mientras propiedades funcionales dependientes de interacciones proteína-proteína e hidrofobicidad de superficie como capacidad emulsificante y espumante pueden presentar un incremento al inicio de la congelación (debido a la desnaturalización) con un subsecuente decremento (debido a la agregación) (Mignino *et al.*, 2008). Sin embargo, este comportamiento puede variar dependiendo de la especie evaluada (Benjakul *et al.*, 2005; Ganesh *et al.*, 2006).

Kovačević y Mastanjević (2011) demostraron que los principales cambios en la desnaturalización de la miosina y actina de surimi de músculo de res ocurren en los primeros 30 días de almacenamiento en congelación (-30 °C), especialmente en ausencia de crioprotectores. Resultados similares se han reportado por Benjakul *et al.* (2003 y 2005) desde el punto de vista estructural y funcional en músculo de curvina, pez lagarto, pargo patón y pargo dorado.

CONDICIÓN DE LA MATERIA PRIMA. El estado físico de la materia prima previo a la congelación es un factor que determina la calidad de los productos pesqueros congelados desde el punto de vista sensorial y funcional. Carvajal *et al.* (2005)

exponen que la calidad final del pescado congelado es una función de la velocidad de pérdida de calidad y la calidad inicial.

Previo a la congelación, es necesario la evisceración rápida y el mantenimiento de temperaturas bajas de los productos pesqueros para evitar la acción de enzimas proteolíticas y proliferación de microorganismos durante la congelación-descongelación (Evans, 2008). Así mismo, el descabezado en la producción de pescado molido y surimi congelado reduce el contenido de lípidos del producto final (Lanier *et al.*, 2005), lo que reduce la tasa de deterioro del producto durante el almacenamiento como resultado de la oxidación de lípidos.

En el mercado de los productos pesqueros, es común encontrar la comercialización del músculo de pescado en forma de "*mince*", es decir, en forma de bloques de músculo molido como materia prima para la elaboración de surimi y productos con valor agregado. Esto se debe a que la utilización de deshuesadoras automáticas (cuyo producto final es el músculo de pescado molido), permite un mejor aprovechamiento de los recursos ofreciendo rendimientos superiores a los obtenidos por medio del fileteo manual (Licciardello *et al.*, 1980). Sin embrago, el almacenamiento del músculo de pescado en forma de *mince* provoca la aceleración de su deterioro y pérdida de funcionalidad con respecto al almacenamiento del músculo entero (en forma de filete) (MacDonald *et al.*, 1990).

Babbitt *et al*. (1972) reportaron los cambios de solubilidad en sal de las proteínas del músculo de merluza (*Merluccius productus*) almacenado en congelación entero y molido, asociado al contenido de dimetilamina (DMA) y formaldehido (FA). Estos autores observaron una fuerte caída de la solubilidad en sal durante el almacenamiento en congelación a -20 °C, la cual fue más pronunciada en el músculo almacenado molido, siendo este tratamiento el que presentó los valores más altos de DMA y FA durante el almacenamiento. También encontraron que el proceso de molienda provocó el incremento de 2-4 veces el contenido de DMA y FA con respecto al músculo entero y que las proteínas miofibrilares fueron las más afectadas durante el almacenamiento, mientras que las proteínas sarcoplásmicas presentaron sólo una ligera reducción de la solubilidad.

Resultados similares a los anteriores fueron reportados por Licciardello *et al.* (1980) en músculo entero y molido de pescadilla *(Merluccius bilinearis)* a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento. En este caso el factor más importante fue la temperatura, detectando que a medida que esta fue más baja, la solubilidad en sal de las proteínas se mantuvo estable. A -30 °C, la solubilidad en sal remanente fue de aproximadamente el 95 % después de 90 días de almacenamiento. El músculo molido mostró siempre menor solubilidad y mayor formación de DMA con respecto al músculo entero, bajo condiciones similares de almacenamiento. Estos resultados fueron similares a los encontrados realizando una evaluación sensorial, cuando el músculo fue utilizado como materia prima para hacer barras de pescado cocinado, obteniéndose mejor calidad en el producto terminado hecho a partir de músculo entero. Estos autores muestran una correlación muy fuerte entre el contenido de DMA y los puntajes de textura.

Leelapongwattana *et al*. (2005), reportaron una menor producción de DMA y FA en músculo de pez lagarto (*Saurida micropectoralis*), junto a una menor desnaturalización-agregación cuando el músculo molido fue almacenado en presencia de aire con respecto al almacenado al vacío. Los autores sugieren que la ausencia de oxígeno parece acelerar la formación de FA.

MacDonald *et al.* (1990) desarrollaron el concepto de “pescado molido-estabilizado”, que consiste en la adición de un 12 % de sacarosa y 0.2 % de polifosfatos al músculo molido antes de su congelación. La idea es utilizar esta mezcla para sustituir el surimi en la manufactura de productos o almacenarla como materia prima para la producción de surimi. El resultado del estudio fue que la adición de estabilizantes redujo sustancialmente la producción de DMA, siendo el pescado molido-estabilizado almacenado a -50 °C y -20 °C los que presentaron la mayor estabilidad en términos de producción de DMA y de la textura de los geles hechos a partir del músculo.

La mayoría de estos estudios donde se evalúa el efecto de la molienda durante la congelación se ha realizado utilizando músculo de gadoidos. Esto se debe a que estas especies presentan una alta actividad intrínseca de la enzima OTMA

demetilasa, siendo muy pocos estudios los realizados en otras especies. Así mismo, en estos estudios principalmente se evalúa la solubilidad en sal de las proteínas y las características de calidad del músculo y en muy pocos casos la relación con la capacidad de formar geles.

Estabilidad Funcional de la Miosina

La pérdida de funcionalidad del músculo durante el procesamiento y almacenamiento está directamente relacionada con la desnaturalización de la miosina (Matsumoto, 1980; Park, 1994), debido a que la miosina es la proteína responsable del desarrollo de las propiedades funcionales del músculo. Así, el mantenimiento de las propiedades funcionales del músculo durante la congelación dependen directamente de la estabilidad de la miosina. La estabilidad de la miosina se define como la capacidad que poseen los dos estados de conformación distintivos (la cabeza globular y la cola helicoidal) de mantenerse en su estado de conformación nativo ó “replegado” (Carvajal *et al.,* 2005).

Estabilidad de las Propiedades Funcionales del Músculo de Calamar en Congelación

Se han realizado diferentes estudios del efecto del almacenamiento en congelación sobre las propiedades funcionales del músculo de cefalópodos de diversas especies (Tabla 2). De manera general, se ha observado que el músculo de cefalópodos es estable a la congelación y al almacenamiento en congelación en términos de solubilidad, viscosidad y capacidad emulsificante. En este sentido, son pocos los estudios en los que se ha reportado cambios en las propiedades funcionales del músculo de calamar en congelación, y menos aún, los que asocien estos cambios con las alteraciones que ocurren a nivel estructural en las proteínas musculares.

Mignino *et al.* (2008), Paredi *et al.* (2006 y 1997) y Gómez-Guillén *et al.* (2003) muestran como el cambio de las propiedades funcionales de las proteínas durante la congelación, como la solubilidad en sal, viscosidad, capacidad emulsificante y capacidad gelificante, están relacionadas con los cambios estructurales de las proteínas evaluados a través de técnicas como hidrofobicidad de superficie, SDS-PAGE, reología y actividad Mg^{2+} ATPasa.

SOLUBILIDAD EN SAL. Una de las propiedades funcionales en las que se ha reportado mayor estabilidad de las proteínas del músculo de calamar es la solubilidad en sal (SS). Goméz-Guillén *et al.* (2003) no encontraron efecto de la congelación sobre la SS del músculo de calamar *Loligo vulgaris* después de someterlo a 1 mes de almacenamiento en congelación a -20 °C. Así mismo, Moral *et al.* (2002) y Ruiz-Capillas *et al.* (2002) reportaron que la SS remanente de las proteínas del músculo de calamar *Toradopsis eblanae* e *Illex conidetii* fue del 60 % después de almacenar el músculo en congelación a -20 °C durante 12 y 16 meses respectivamente.

La estabilidad de la SS de las proteínas musculares parece ser dependiente del estado de madurez del calamar. Mignino *et al.* (2008) reportaron no haber encontrado diferencias significativas en la SS (KCl 0.6 M) del músculo de calamar *Illex argentinus* almacenado en congelación por 9 meses a -30 °C, cuando fueron evaluados organismos en estado de madurez avanzado. Mientras que Paredi *et al.* (2006) mostraron una dramática caída de la SS, de alrededor del 50-60 %, utilizando la misma especie de calamar bajo condiciones experimentales similares, pero utilizando organismos inmaduros. Sin embargo, pudiera haber otros factores involucrados, ya que Paredi y Crupkin (1997) reportaron una caída del 70 % de la SS de las proteínas del músculo de calamar *Illex argentinus* independientemente del estado de madurez.

Tabla 2. Estudios realizados del efecto de la congelación sobre propiedades funcionales de diferentes especies de calamar.

Autor (es)	Especie	Factor (es)	T (°C)	tiempo (meses)	V. respuesta	Resultados
Moral *et al.* (2002) (Inst. del Frío, Madrid, España)	*Toradopsis eblanae*	- Género - Edo. Madurez - Región anatómica - Tiempo	-20	12	- Solubilidad * Sal * Ácido	-Se encontraron diferencias en edo. de madurez y región anatómica. - No hubo diferencias de acuerdo al sexo. - Se encontró posible efecto del rigor mortis en el patrón de solubilidad en sal con respecto al tiempo en congelación. - Estabilidad de la solubilidad en congelación (solubilidad remanente del 60 %)
Ruíz-Capillas *et al.* (2003) (Inst. del Frío, Madrid, España)	*Toradopsis eblanae*	- Edo. Madurez - Sexo - Región anatómica	-20	12	- Viscosidad aparente - Capacidad emulsificante	- Se observó una fuerte caída de la viscosidad. - La capacidad emulsificante fue estable a la congelación con descensos de poca intensidad. - No hubo diferencias por sexo, pero sí por edo. de madures y por región anatómica. - Hubo una mayor caída de la viscosidad en organismos inmaduros. - Disminuyó 25 % la capacidad emulsificante en el tiempo de almacenamiento.
Paredi *et al.* (2006) (Universidad del mar de plata, Argentina)	*Illex argentinus* (inmaduros; edo. madures: 2-3) (con vísceras)	- Género - Tiempo	-30	9	- Viscosidad - Solubilidad en sal	Disminución constante de la solubilidad (la viscosidad presenta una tendencia similar) Disminución de la cadena pesada de la miosina e incremento de los productos de su degradación (prueba de proteólisis durante la congelación)
Mignino *et al.* (2008) (Universidad del mar de plata, Argentina)	*Illex argentinus* (maduros; edo. madures: 4-5) (con vísceras)	- Tipo de captura - Tiempo	-30	9	- Solubilidad en sal - Viscosidad - Hidrofob. de superficie - Capacidad emulsificante	- No hubo cambios en la solubilidad durante el almacenamiento. - Disminuyó la viscosidad con respecto al tiempo (parece corresponder con la hidrofobicidad) - Disminución de la cadena pesada de la miosina e incremento de los productos de su degradación (prueba de proteólisis durante la congelación)

De La Fuente-Betancourt *et al.* (2009) (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México)	*Dosidicus gigas*	-Congelación - Región anatómica	-30	12	- Análisis de perfil de textura y Capacidad de retención de agua de geles	- Geles elaborados a partir de manto o aletas sin congelar tienen la misma CRA a la de geles hechos con manto o aleta congelados respectivamente - Mediante el Análisis de Perfil de textura se encontró valores semejantes de dureza, cohesividad y elasticidad en geles hechos a partir de una mezcla de aleta/manto independientemente si fueron congelados o no. -No se ajustó el contenido de humedad de los geles.
De La Fuente-Betacourt *et al.* (2008)	*Dosidicus gigas*	Congelación	-20	12	Microscopía del tejido muscular	Las fibras se contraen y se forman espacios con forma circular esférica (por la formación de cristales de agua)
Pérez-Mateos *et al.* (2002) (Inst. del Frío, Madrid, España)	*Loligo vulgaris*	- Transglutami-nasa microbiana (TGM) - Inhibidores - Tiempo	-50	5	- Actividad enzimática - Solubilidad (gel) - Gelificación - Prueba de doblado	- La actividad enzimática se reduce después de 5 meses en congelación - La adición de inhibidor de proteasas incrementa la dureza y elasticidad de los geles - La TGM tuvo un importante efecto en la capacidad de gelificación (fue sinérgico con la utilización de inhibidores)
Gómez-Guillén *et al.* (2003) (Inst. del Frío, Madrid, España)	*Loligo vulgaris*	-Congelación - Tiempo	-20	1	- Extracción en sal - Viscosidad - Actividad autolítica - Prop. viscoelásticas	- La solubilidad y viscosidad fue 12 y 4.5 % menor después de 1 día de congelación. - La solubilidad y viscosidad fueron estables durante la congelación (no hubo cambios significativos). - La actividad proteolítica al día 1 fue del 64 % con respecto al músculo fresco - La actividad proteolítica incrementó 3 veces después del periodo de almacenamiento. - Hubo evidencia de proteólisis durante la congelación (electroforesis)

Ruíz-Capillas *et al.* (2002) (Inst. del Frío, Madrid, España)	*Illex conidetii*	- Género - Región anatómica - Tiempo - Eviscerado	-20	16	- Solubilidad en sal - Viscosidad - Colágeno soluble - Capacidad emulsificante	- Se observó un incremento inicial de la solubilidad (proteólisis) y posteriormente un decremento (agregación). La solubilidad remanente después del almacenamiento fue del 60 % - Se observó una drástica caída de la viscosidad durante el primer mes y medio de almacenamiento. No hubo diferencias de viscosidad entre tratamientos - Hubo diferencias en la capacidad emulsificante entre tratamientos (puede ser la mejor técnica para ver diferencias entre lotes) - La solubilidad y capacidad emulsificante fue mayor en los organismos con vísceras - La viscosidad no brindó información útil de los cambios en las proteínas.

Según Ruiz-Capillas *et al.* (2002) el aumento de la SS de las proteínas del músculo de calamar *Illex conideti* almacenado a -20 °C, está influenciado por el estado de *rigor* del músculo antes de la congelación, encontrando un incremento de la SS de las proteínas desde el inicio del almacenamiento hasta el octavo mes. Posteriormente, la SS cayó de manera constante desde un 80-90 % hasta un 55-70 % en el mes número 16 de almacenamiento. Este incremento inicial de la solubilidad lo atribuyen a la acción endógena de enzimas involucradas en la resolución del *rigor mortis,* mientras que el posterior decremento de la SS es atribuido a la agregación de las proteínas.

CAPACIDAD EMULSIFICANTE. La capacidad emulsificante (CE) es una variable relativamente estable al estrés por congelación. Ruiz-Capillas *et al.* (2003 y 2002) reportaron un ligero decremento de aproximadamente 20 % en la CE del músculo de calamar *Toradopsis eblanae* e *Illex conidetii* después de 10 y 11 meses en congelación, respectivamente. Sin embargo, cuando los organismos fueron almacenados con vísceras, la acción de proteasas endógenas provocó un incremento de la CE de aproximadamente el 10 % desde el inicio del almacenamiento hasta el mes 6, con un decremento a valores similares a los encontrados al inicio del almacenamiento después de 11 meses en congelación. El inicial incremento puede asociarse a la acción de proteasas que pueden provocar un incremento en la CE del músculo debido a la formación de péptidos con mayor capacidad de adsorberse a la interfase agua-grasa (Foegeding *et al*., 2000) mientras la posterior caída se puede asociar a la agregación de las proteínas.

La evolución de la CE puede afectarse por el método de captura. Mignino *et al.* (2008) reportaron una caída de la CE del 40 % en músculo de calamares capturados con poteras después de 3 meses en congelación, mientras que en calamares capturados con redes de arrastre se observó un incremento de la CE al primer mes, para posteriormente caer hasta el quinto mes. La estabilidad de la emulsión (EE) fue significativamente mayor durante el almacenamiento en las muestras capturadas con redes de arrastre con respecto a las capturadas con

poteras. Los mayores valores de CE y EE encontrada en calamares capturados por redes de arrastre, fue atribuido a una mayor desnaturalización de las proteínas debido al método de captura, lo que se reflejó en una mayor exposición de grupos hidrofóbicos.

VISCOSIDAD. La viscosidad es una variable muy sensible al almacenamiento en congelación. En la mayoría de los estudios se reportan fuertes caídas de la viscosidad de soluciones de proteína de músculo de calamar congelado al principio del almacenamiento.

Ruiz-Capillas *et al.* (2002) observaron una dramática caída de alrededor del 90 % en la viscosidad de soluciones proteicas de músculo de calamar *Illex conidetii* después de 1.5 meses de almacenamiento en congelación. Así mismo, Ruiz-Capillas *et al.* (2003) reportaron una caída de la viscosidad aparente hasta valores cercanos a cero en músculo de calamar *Toradopsis eblanae* durante su almacenamiento en congelación, caída ocurrida prematuramente en organismo inmaduros con respecto a organismos maduros. Paredi *et al.* (2006) y Paredi y Crupkin (1997) reportaron una caída del 80 % de la viscosidad en músculo de calamar *Illex argentinus* después de 9 meses de almacenamiento en congelación. Contrariamente, Gómez-Guillén *et al.* (2003) no encontraron variaciones en la viscosidad de soluciones de proteína de músculo de calamar *Loligo vulgaris* después de almacenarse 1 mes a -20 °C.

Mignino *et al.* (2008), encontraron que existe una correlación entre la viscosidad de soluciones de proteína de músculo de calamar y la hidrofobicidad de superficie de las proteínas. A medida que la hidrofobicidad se vio incrementada durante el almacenamiento en congelación, la viscosidad disminuyó siguiendo una tendencia opuesta. La reducción de la viscosidad fue entre 25 y 50 % después de 9 meses dependiendo del método de captura. Esto se puede deber a que el incremento de la superficie hidrofóbica de la proteína modifica las interacciones proteína-agua y capacidad de hinchamiento de las mismas (Foegeding, 2000), manifestándose en la reducción de la viscosidad.

CAPACIDAD GELIFICANTE. A diferencia de la solubilidad en sal, el efecto de la congelación y almacenamiento sobre la capacidad gelificante del músculo de calamar es una propiedad funcional que ha sido muy poco estudiada. Sin embargo, parece haber indicios de estabilidad durante la congelación.

Gómez-Guillén *et al.* (2003) reportaron que el comportamiento térmico-reológico durante la gelificación térmica del músculo de calamar *Loligo vulgaris* almacenado a -20 °C, muestra un incremento en los valores del módulo de elasticidad (G') y módulo de viscosidad (G'') con respecto al músculo fresco, observándose que este efecto se incrementó conformé transcurrió el almacenamiento en congelación. Los autores atribuyen este incremento en las propiedades viscoelásticas del músculo a la inactivación de enzimas proteolíticas endógenas (probablemente calpainas y catepsina D), como resultado de la congelación y almacenamiento en congelación. Exponen que la disminución de la actividad proteolítica puede ser un efecto de alteraciones de sustratos específicos (proteínas miofibrilares). En estudios previos, Gómez-Guillén *et al.* (2002) demostraron en esta misma especie, que la acción de inhibidores de enzimas mejoró la gelificación térmica del músculo, especialmente con la adición de inhibidores específicos de enzimas serinproteasas como el Floruro de Metil Fenil Suilfonil (PMSF).

Peréz-Mateos *et al.* (2002) reportaron una fuerte caída de la actividad proteolítica del músculo de calamar *Loligo vulgaris* después de 5 meses de almacenamiento en congelación, lo que correspondieron al incremento del G' y G'' del músculo. Así mismo, la adición de inhibidores de enzimas provocó el incremento de la capacidad gelificante en términos reológicos y en términos de dureza y elasticidad de geles hechos a partir del músculo mediante el análisis de perfil de textura.

De La Fuente *et al.* (2009) reportaron que la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante *Dosidicus gigas,* medida en términos de dureza, cohesividad y elasticidad (a través de un análisis de perfil de textura), no se vio afectada después de congelar el músculo durante 1 año a -30 °C, comparándolo con el músculo fresco. Sin embargo, estos resultados fueron de carácter preliminar y los autores mencionan no haber realizado el ajuste de humedad durante el proceso

de elaboración de los geles. Además, se omitieron detalles metodológicos y estadísticos que no permiten dilucidar con claridad el efecto de la congelación sobre la capacidad gelificante. Esto, hace necesario llevar a cabo estudios adicionales que permitan establecer con certeza si existen o no cambios en las proteínas tanto a nivel funcional como a nivel estructural.

Lo antes expuesto, deja claro que son pocos los estudios enfocados a la evaluación integral de los cambios en las propiedades funcionales y específicamente, sobre la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) almacenado en congelación. La generación de este conocimiento permitirá tener un mejor entendimiento de la especie desde el punto de vista científico-tecnológico, de manera que este conocimiento sea útil para establecer las condiciones adecuadas durante el almacenamiento del manto de calamar gigante.

HIPÓTESIS

“La capacidad gelificante de las proteínas del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) congelado es similar a la encontrada en el manto fresco, independientemente del manejo (molienda) de la materia prima y tiempo de almacenamiento”.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios de la capacidad gelificante y propiedades estructurales de las proteínas del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), después de ser congelado y almacenado a -20 °C durante un periodo de 1 y 30 días bajo dos condiciones de manejo: entero y molido.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los cambios de la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante después de ser congelado y almacenado a -20 °C durante un periodo de 1 y 30 días bajo dos condiciones de manejo: entero y molido.

2. Evaluar los cambios estructurales asociados a la desnaturalización y/o agregación de las proteínas involucradas en el proceso de gelificación del músculo de calamar, después de la congelación y almacenamiento del músculo a -20 °C durante un periodo de 1 y 30 días bajo dos condiciones de manejo: entero y molido.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en dos etapas. Cada etapa se diseñó para cubrir cada objetivo específico. Para la primera etapa, los geles de calamar fueron evaluados mediante un análisis de perfil de textura (APT), prueba de doblado (PD) y capacidad de retención de agua (CRA). Paralelamente se evaluó en el músculo de calamar la composición proximal, contenido de nitrógeno no proteico (NNP) y pH. Para la segunda etapa se evaluaron los cambios estructurales (desnaturalización y agregación) de las proteínas del músculo durante la congelación, mediante calorimetría diferencial de barrido (CDB) e hidrofobicidad de superficie (SoANS).

Obtención y Preparación de la Materia Prima

Para la realización de ambas etapas se utilizó sólo el manto del calamar gigante (*Dosidicus* gigas). Todos los calamares fueron capturados de noche, con poteras y eviscerados a bordo de la embarcación.

La materia prima para llevar a cabo la etapa 1 se obtuvo de dos muestreos en los meses de diciembre de 2010 y mayo de 2011, obteniéndose un total de 8 y 10 calamares, respectivamente. Los organismos obtenidos en diciembre fueron capturados por pescadores de Bahía de los Ángeles, Baja California y transportados en hielo hasta Guaymas, Sonora, por la empresa Novaoceano, mientras los organismos obtenidos en mayo fueron capturados por pescadores en las costas de Guaymas, Sonora. En ambos muestreos los calamares fueron empacados en bolsas de plástico y transportados en capas de hielo-calamar-hielo a las instalaciones del CIAD A.C. para su evaluación. En el momento de su

análisis, el calamar capturado en diciembre y mayo tenía aproximadamente 4 y 2 días pos captura, respectivamente.

La materia prima para llevar a cabo la etapa 2 se obtuvo de dos muestreos en los meses de febrero y junio de 2011, obteniéndose un total de 6 y 12 calamares, respectivamente. Los calamares obtenidos en febrero, fueron adquiridos directamente de pescadores de la localidad de Puerto Libertad, Sonora, mientras los obtenidos en junio fueron capturados por un barco calamarero en el Mar de Cortés cerca de la isla Ángel de la Guarda, B. C. En ambos casos los organismos fueron transportados en hielo bajo condiciones comerciales a Bahía de Kino, Sonora, donde fueron empacados en bolsas de plástico y transportados en capas de hielo-calamar-hielo a las instalaciones del CIAD A.C. para su evaluación. En el momento de su análisis, el calamar capturado en febrero y junio tenía aproximadamente 2 días pos captura.

La materia prima obtenida de los muestreos en ambas etapas fue procesada en un cuarto refrigerado a <10 °C. El manto fue separado de la cabeza, aletas y tentáculos registrándose su peso y longitud. Posteriormente, el manto se limpió, se retiró la piel, se lavó con agua purificada y se cortó en cuadros de aproximadamente 3 centímetros.

Tratamientos

Los recortes de cada manto fueron separados en tres partes, aplicándosele un tratamiento diferente a cada una de ellas. La Figura 8 ejemplifica la secuencia y tratamientos utilizados en el estudio.

Las primera parte del manto fue molida en un molino de carne HOBAR modelo 52, integrado con un cedazo de acero inoxidable de 3/8 de pulgada (0.95 cm) de diámetro. La temperatura de la materia prima a la entrada de la operación fue de 0

°C y la de salida a 8 °C aproximadamente. El músculo molido fue almacenado en una cámara de congelación a -20 °C. A este tratamiento se le denomino “molido-congelado” (MC). La segunda parte del calamar fue almacenada en congelación a -20 °C sin someterse al proceso de molienda (músculo entero). A este tratamiento se le denomino “entero-congelado” (EC). La tercera parte fue molida bajo las mismas condiciones que el músculo MC sin someterse al proceso de congelación, utilizándose como control. En el resto del escrito nos referiremos a este tratamiento como músculo “fresco” (F).

Tanto el músculo MC y EC fueron almacenados durante 1 día y 30 días en congelación, etiquetándose estos tratamientos con la clave: MC1, MC30, EC1 y EC30, respectivamente. Para la evaluación, todos los tratamientos fueron descongelados en una cámara de refrigeración a 4 °C durante 24 horas. Finalmente, los tratamientos EC1 y EC30 fueron sometidos al proceso de molienda una vez descongelados bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Adicionalmente, se elaboró una curva de enfriamiento tiempo contra temperatura durante el proceso de congelación. Para ello se utilizaron termopares de penetración tipo T marca Ecklund Harrison de cobre constantán para alimentos, cuya temperatura mínima de detección era de -50 °C. La temperatura fue monitoreada con ayuda de un indicador de temperatura para termopares marca Barnant modelo 690 0000. El termopar fue colocado en el centro térmico del músculo molido o del filete de calamar. Posteriormente el músculo fue transferido de la cámara de refrigeración a la cámara de congelación de -20 °C. Se registró la temperatura del músculo cada 5 minutos durante los primeros 150 minutos y después cada 15 minutos hasta el final del proceso de congelación. Se colocaron termopares en diferentes zonas de la cámara de congelación con la finalidad de monitorear la temperatura del aire.

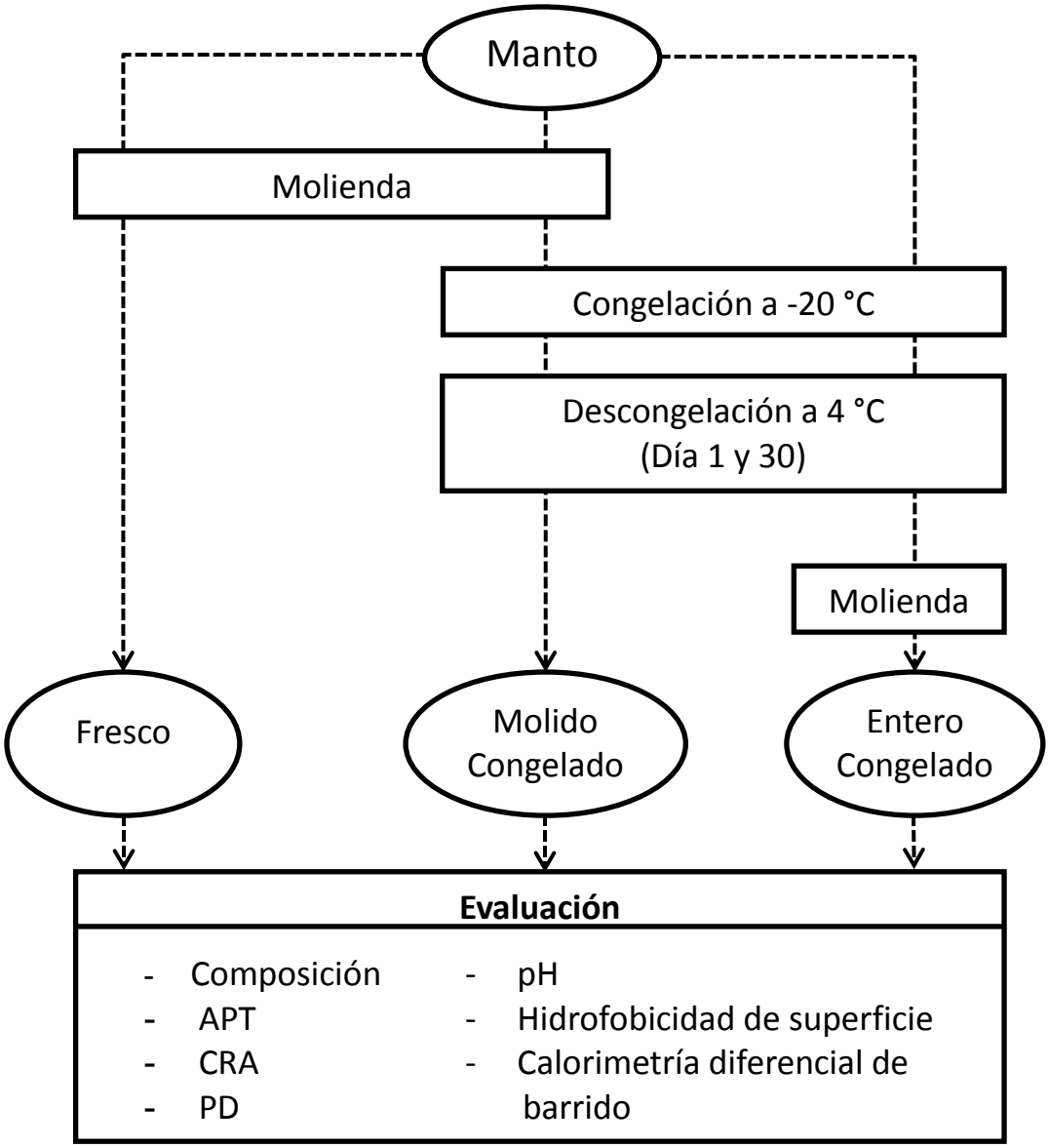

Figura 8. Diagrama de flujo del diseño experimental

Proceso de Elaboración de Geles

El proceso de elaboración de geles fue abordado en tres etapas. 1) Elaboración del sol; 2) Tratamiento térmico; 3) Estabilización del gel. Cada una de ellas de describe a continuación:

1) *Elaboración del sol*. Para todos los tratamientos del estudio (F, MC1, MC30, EC1 y EC30), 150 g de músculo molido fueron adicionados con 2.5 % de NaCl (p/p). La mezcla fue homogenizada en intervalos de 15 segundos durante 2 minutos en un procesador de alimentos Plus Cuisinart Modelo DLC-8 (Cuisinart Inc., Greenwich, CT). En caso de ser requerido, se agregó hielo molido o azúcar con la finalidad de ajustar el contenido de humedad a un 80 %. Cada sol fue depositado en una caja petri de vidrio (1 cm de alto) procurando evitar la formación de burbujas de aire. Posteriormente fueron empacados al vacío en bolsas plásticas de tres capas (Nylon 0.75 MIL-Adhesivo-Polietileno 2.25 MIL) impermeables a la humedad y vapor (Cryovac Corp., Duncan, SC) con ayuda de una empacadora al vacío (Smith Equipment Co., Clifton, NJ).

2) *Tratamiento térmico*. Los soles obtenidos y empacados al vacío fueron sometidos a un tratamiento térmico para su gelificación, mediante su inmersión en un baño de agua a una temperatura de 90 °C durante 30 minutos. Posteriormente, fueron enfriados mediante su inmersión en un baño de agua-hielo durante 30 minutos.

3) *Estabilización del gel*. Los geles pre-enfriados fueron almacenados a una temperatura entre 0-4 °C durante 18 horas con la finalidad de estabilizar las fuerzas intermoleculares de los componentes del gel. Transcurrido el tiempo de almacenamiento fueron realizadas las pruebas de funcionalidad como se describe a continuación.

Caracterización de la Materia Prima y de los Geles

Composición

Se evaluó la composición proximal (humedad, proteína cruda, cenizas y grasa) del músculo de calamar obtenido de cada muestreo (diciembre, febrero, mayo y junio) y el contenido de humedad y proteína cruda de los geles elaborados de cada tratamiento (F, MC1, EC1, MC30 y EC30) según la metodología descrita por la AOAC (2000). Adicionalmente fue cuantificada la fracción de nitrógeno no proteico (NNP) presente en el músculo de calamar como lo describe Woyewoda *et al.* (1986) para obtener el contenido de proteína ajustada mediante la siguiente fórmula:

$$P = Pc - NNP$$

donde:
P: Contenido de proteína ajustado
Pc: Contenido de proteína cruda
NNP: Contenido de nitrógeno no proteico

pH

El pH fue medido a 25 °C utilizando un potenciómetro digital Corning Modelo 240 (Corning Inc., Corning, NY). Para ello el electrodo fue colocado directamente en contacto con el músculo molido de cada tratamiento (F, MC1, EC1, MC30 y EC30). La medición se realizó por cuadruplicado.

Evaluación de la Capacidad de Formar Geles (CFG)

Los geles obtenidos a partir de los tratamientos (F, MC1, MC30, EC1 y EC30) se mantuvieron a 25 °C durante 1 h previo a su evaluación. La CFG se evaluó en función de la prueba de doblado y del análisis de perfil de textura.

Prueba de Doblado (PD)

La PD se realizó como lo describe Tanikawa *et al.* (1985). Una rebanada de gel de 3.0 mm de espesor por 30.0 mm de diámetro, se dobló entre los dedos índice y pulgar. El doblado se lleva a cabo primero a la mitad y posteriormente en cuadrantes. Dependiendo del comportamiento del gel durante cada doblado, se le asignó un valor utilizando la escala que se muestra en la Tabla 3.

Análisis de Perfil de Textura (APT)

El APT se realizó en muestras de gel de forma cilíndrica con dimensiones uniformes de 1 cm de diámetro y 1 cm de altura. Se utilizó un equipo Texture Lab Pro (Food Technology Corp., Sterling, VA) con un dispositivo de 3 cm de diámetro unido a una celda de carga de 100 N. Se llevó a cabo una doble compresión al 75 % de deformación. A partir de los gráficos obtenidos (Figura 9), los datos generados fueron analizados a través del programa *Texture Expert* para calcular los parámetros primarios de dureza, cohesividad y elasticidad de los geles de la siguiente manera:

Tabla 3. Escala de evaluación de la calidad de geles mediante la prueba de doblado.

Calificación	Criterio	Característica del gel
AA (5)	El gel se dobla en cuadrantes	Extremadamente elástico
A (4)	El gel se dobla por la mitad pero se rompe al doblarse en cuadrantes	Moderadamente elástico
B (3)	El gel se rompe lentamente al doblarse por la mitad	Ligeramente elástico
C (2)	El gel se rompe rápidamente al doblarse por la mitad	No elástico
D (1)	El gel se desmorona en los dedos	Pobre

Entre paréntesis: calificación ordinal. Referencia: Tanikawa *et al.* (1985).

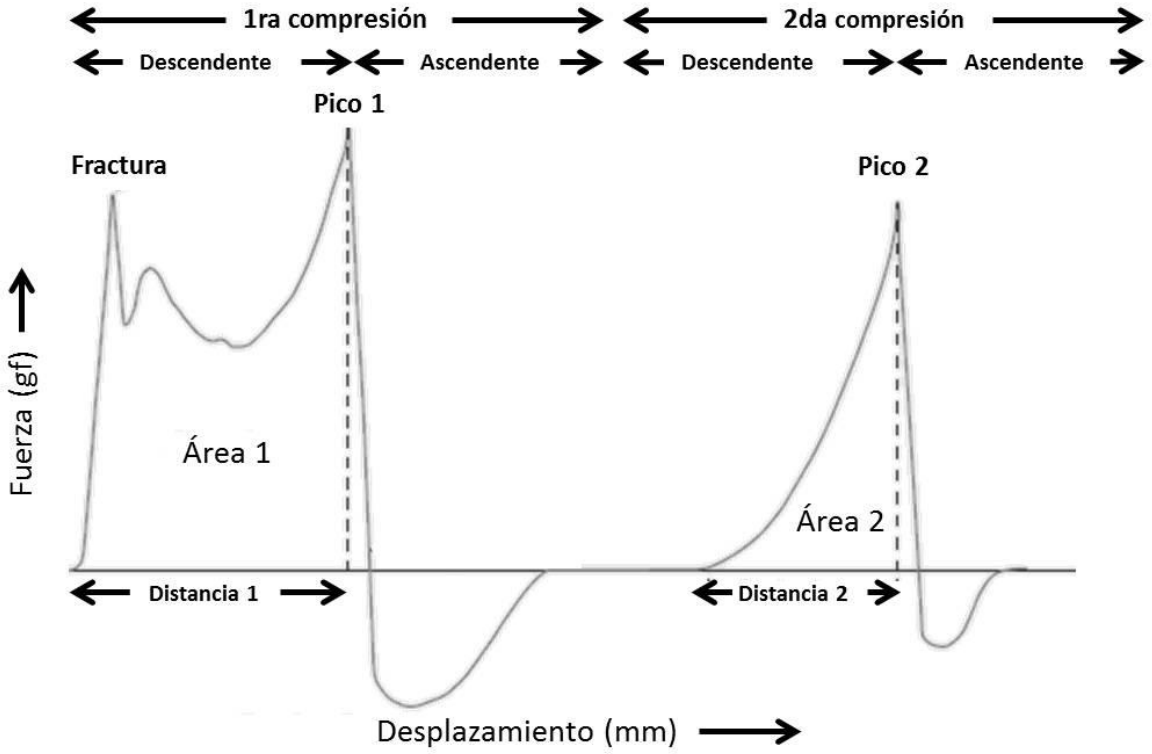

Figura 9. Curva generalizada del análisis de perfil de textura. Adaptado de Bourne (2002).

$$\text{Dureza (gf/g)} = \frac{\text{Fuerza máxima en el pico 1}}{\text{Peso de la muestra}}$$

$$\text{Cohesividad (\%)} = \frac{\text{Area 2}}{\text{Area 1}} \text{ X } 100$$

$$\text{Elasticidad (\%)} = \frac{\text{Distancia 2}}{\text{Distancia 1}} \text{ X } 100$$

Capacidad de Retención de Agua (CRA)

La CRA se evaluó mediante la centrifugación de 5 g de muestra de gel a 3000 g por 20 minutos a 4 °C (Jiang *et al.*, 1985), en una centrífuga refrigerada Beckman Modelo J2-21 (Beckman Instrument Inc. Palo Alto, CA). La CRA fue expresada en dos modalidades: como porcentaje de agua retenida en relación a la cantidad de agua total presente en la muestra antes de centrifugar (CRA-1) y como la cantidad de agua retenida por gramo de proteína presente en el gel (CRA-2) (Chung *et al.*, 1994).

Evaluación de la Desnaturalización-Agregación Proteica

Se evaluaron los cambios conformacionales asociados a la desnaturalización y agregación de las proteínas del músculo de calamar durante la congelación, mediante la medición de la hidrofobicidad de superficie y el perfil térmico de las proteínas.

Hidrofobicidad de Superficie (SoANS)

Para evaluar la hidrofobicidad de superficie de las proteínas del músculo de calamar, fue necesario realizar previamente una extracción de las mismas. Esto se logró siguiendo la metodología descrita por Kang *et al.* (2008).

Para la extracción se utilizaron 5 g de muestra, los cuales fueron mezclados con 100 mL de un buffer de extracción frío (0-4 °C), conteniendo un 2.5 % de NaCl y 10 mM de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4, ajustado a pH 6.2 con HCl 1 M. La mezcla se homogenizó en un homogenizador de tejidos marca Tissumizer modelo TR-10 (Tekmar Co., Cincinnati, OH) a una velocidad de 13000 rpm durante 1 minuto. El homogenizado se colocó en una placa de agitación 30 minutos sumergido en una mezcla de agua-hielo y se centrifugó a 5000 × g por 20 minutos a 4 ºC, utilizando una centrifuga refrigerada marca Beckman modelo J2-21 (Beckman Instrument Inc. Palo Alto, CA). El sobrenadante obtenido fue diluido con el mismo buffer de extracción en una proporción 1:3 solución:buffer (v/v) para obtener una concentración final aproximada de 1 mg/mL. La concentración de proteína de esta solución se midió por el método del ácido bicinconinico (BCA) utilizando un kit para su cuantificación (Pierce® BCA Protein Assay Kit; Smith *et al.*, 1985), usando como estándar albúmina sérica bovina (BSA). Una vez extraída la proteína, se preparó una solución de abastecimiento 8 mM de ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS) con el mismo buffer de extracción utilizado en la extracción de la proteína descrita anteriormente y en matraces opacos el mismo día de la medición de las muestras.

La evaluación de la hidrofobicidad de superficie se realizó de acuerdo al método propuesto por Alizadeh-Pasdar y Li-Chan (2000). Las soluciones de proteína obtenidas anteriormente fueron diluidas de manera seriada con el buffer de extracción a concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mg de proteína por mL. Paralelamente fue elaborada una dilución seriada de BSA a partir de una solución concentrada de 1 mg/mL para ser utilizada en la prueba como proteína modelo. Para la prueba, 25 µL de la solución de ANS fueron mezclados con 5 mL de cada

dilución preparada. Las soluciones fueron agitadas con ayuda de un vortex durante 10 segundos. Antes de llevar a cabo la medición las muestras se dejaron en reposo durante 15 minutos para asegurar que se estableciera el equilibrio de la reacción. La intensidad de fluorescencia relativa (IFR) de los conjugados ANS-proteína se midió con ayuda de un espectrofotómetro de fluorescencia LS50B (Perkin-Elmer de México, S.A., Monterrey, México) a una longitud de onda de excitación de 390 nm y rango de emisión de 460-490 nm con anchos de ranura de 1 nm (Figura 10a). La hidrofobicidad de las proteínas se consideró como la pendiente inicial obtenida de la IFR a 470 nm contra la concentración de proteína (Figura 10b). Cada muestra fue corrida por duplicado.

Se propuso que los valores de SoANS de las muestras problema se expresaran como la fracción de la hidrofobicidad con respecto al BSA como se muestra en la siguiente fórmula:

$$\text{SoANS} = \frac{\text{SoANS (X)}}{\text{SoANS (BSA)}}$$

SoANS: Hidrofobicidad relativa al BSA.

SoANS (X): Hidrofobicidad de la muestra.

SoANS (BSA): Hidrofobicidad del BSA.

Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

La CDB se realizó siguiendo la metodología descrita por Yongsawatdigul *et al.* (2004), empleando un calorímetro diferencial de barrido Perkin Elmer modelo DSC7 (Perkin Elmer de México, S.A., Monterrey, México) calibrado. Para la prueba se pesaron 50 mg de muestra de cada tratamiento (F, MC1, EC1, MC30 y EC30) directamente en celdas de acero inoxidable de alta presión cuidando una distribución homogénea de la muestra y asegurando un buen contacto entre la muestra y el fondo de la celda. Posteriormente, las celdas fueron selladas herméticamente utilizando una prensa manual (Perkin Elmer). Las muestras

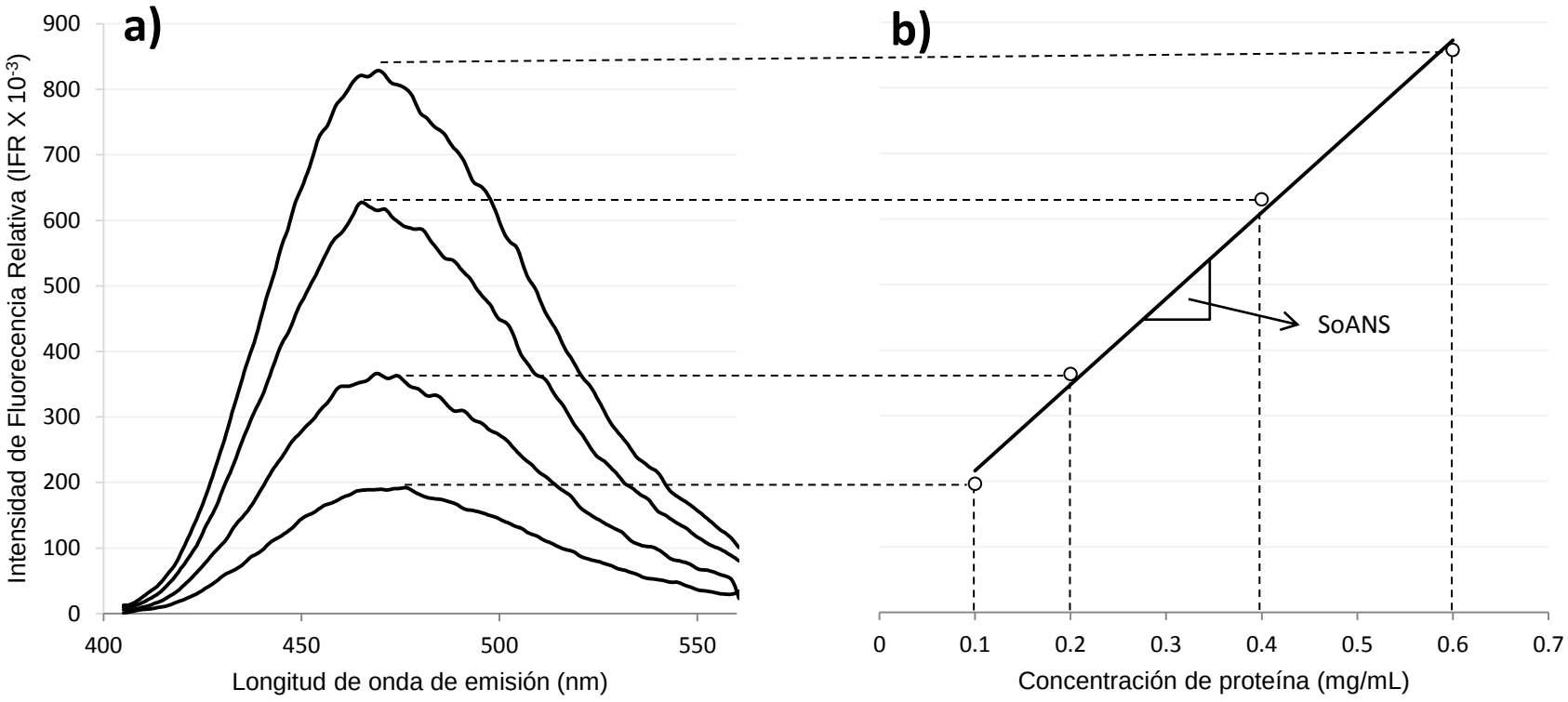

Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia del complejo proteína-ANS a diferentes concentraciones de proteína (a); Calculo de la hidrofobicidad de superficie (SoANS) como la pendiente de la Intensidad de fluorescencia a 470 nm con respecto a la concentración de proteína (b).

fueron escaneadas a 5 °C/min en un rango de 15 a 95 °C utilizándose una celda vacía (con aire) como referencia. Durante el experimento fue utilizado nitrógeno para purgar el aire a una velocidad de 20 mL/min. Los termogramas generados fueron analizados utilizando el software Pyris-Versión 8.0.0.0172 (Perkin Elmer, Inc., 2006) para calcular los parámetros termodinámicos de temperatura (T_{max}) y entalpía (ΔH) de transición térmica.

Análisis Estadístico

Para el análisis de las variables de longitud, peso y composición (humedad, proteína cruda, lípidos y cenizas) del manto, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un diseño completamente al azar. Esto, con la finalidad de evaluar si existen diferencias en las características de la materia prima entre muestreos (diciembre, febrero, mayo y junio). Por otro lado, este mismo diseño fue utilizado para las variables de pH del manto y contenido de humedad y proteína de los geles elaborados por tratamiento (F, MC1, MC30, EC1 y EC30).

Para el análisis de las variables del APT, PD y CRA de los geles, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) con diseño en bloques completos, donde la covariable fue el contenido de proteína de los geles y la variable de bloqueo el músculo de calamar.

Para el análisis de las variables de CDB y SoANS del músculo de calamar se realizó un ANOVA con un diseño en bloques completos, donde el factor de bloqueo fue el músculo de calamar.

En todos los casos se evaluó la normalidad de los datos a través de la prueba de D'Agostino Kurtosis. Cuando los datos no fueron normales, se llevó a cabo la prueba de rangos de Kruskal-Wallis. Cuando los ANOVA fueron significativos para

las variables de longitud, peso y composición, se realizó la prueba de comparación de rangos múltiples de Duncan.

Para las variables de humedad, proteína, APT, PD y CRA de los geles; CDB y SoANS del músculo, se realizó una comparación de medias por contrastes ortogonales agrupando los tratamientos de la siguiente manera:

Contraste C1:	F vs EC1	(Efecto de la congelación)
Contraste C2:	(MC1, MC30) vs (EC1, EC30)	(Efecto de la molienda)
Contraste C3:	(EC1, MC1) vs (EC30, MC30)	(Efecto del tiempo)

Todos los análisis se llevaron a cabo con una probabilidad de 0.05 de cometer un error tipo I (α) en la estimación con ayuda del programa NCSS 2001 (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville Utah). Se consideró que la dispersión de los datos fue aceptable cuando los coeficientes de variación dentro de un mismo tratamiento fueron menores al 15 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los objetivos planteados, esta sección se presenta en tres partes principales: 1) caracterización de la materia prima y composición de los geles, 2) efecto de la congelación sobre la capacidad gelificante y 3) evaluación de la desnaturalización y agregación de las proteínas del músculo de calamar.

Caracterización de la Materia Prima y Composición de los Geles

Primeramente se presentarán los resultados correspondientes a las características de peso-talla y composición química del músculo de calamar de acuerdo a la temporada de captura. Posteriormente, se mostraran las variables fisicoquímicas que pueden tener un efecto sobre las propiedades físicas de los geles, como el pH del músculo, contenido de humedad y proteína.

Peso-Talla del Manto de Calamar

En la Figura 11 se muestran los valores de peso y longitud de manto (LM) obtenidos de los diferentes muestreos. Considerando el peso del manto (kg) se puede realizar la agrupación de los calamares capturados en dos grupos. El primero corresponde a los calamares procedentes de los muestreos de diciembre y febrero, cuyos pesos oscilaron entre 2 y 3 kg aproximadamente, con una LM que varió entre los 50-55 cm. El otro grupo corresponde a los calamares de los muestreos de mayo y junio, los cuales presentaron un menor peso ($p \leq 0.05$) (0.5-0.8 kg) y LM (33-42 cm) con respecto a los organismos de diciembre y febrero.

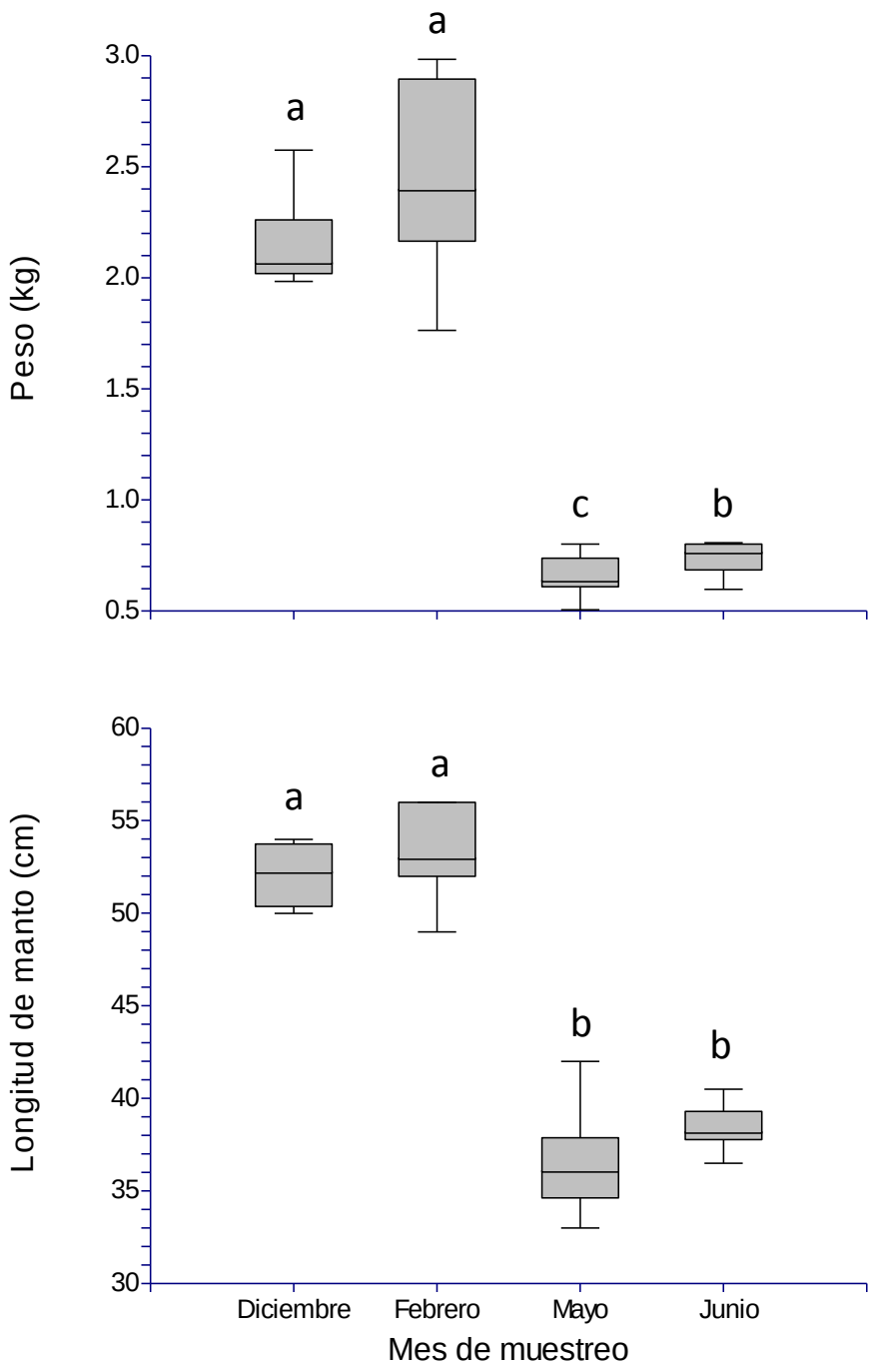

Figura 11. Peso y longitud de manto del calamar gigante por muestreo. Literales diferentes entre muestreos denotan diferencias significativas (p≤0.05). Datos no normales: se muestran las medianas y rango intercuartil.

Velázquez-Abunader *et al.* (2010) reportaron los valores promedio de LM de calamar gigante obtenidos de 7 muestreos oceanográficos realizados entre 1997 y 2008. Los autores reportan haber encontrado durante los meses de junio de 2002 y junio de 2003, calamares de mayor LM (49-50 cm) que los capturados en el presente estudio durante los meses de mayo y junio, pero de similar LM (40 y 35 cm) en mayo de 2004 y junio de 2005. Al igual que en el presente estudio, estos autores encontraron calamares de mayores dimensiones en la temporada de invierno, con LM de 65, 61 y 65 cm para los meses de Noviembre de 1997, Febrero de 2003 y octubre de 2008.

Los resultados del presente estudio son también similares a los de Ramírez-Suárez *et al.* (2008) quienes encontraron los organismo de mayor tamaño en los meses de octubre y noviembre de 2005, mientras que a los organismos de menor tamaño en abril de 2006. Las diferencias en la LM del calamar gigante puede estar asociado a su ciclo reproductivo (Velázquez-Abunader *et al.,* 2010), pero también a la zona de captura en el Golfo de California (Hernández-Herrera *et al.,* 1996).

Hernández-Herrera *et al.* (1996), reportaron los valores de LM de primera madurez gonádica (L_M50 %) del calamar gigante, siendo de 51.6 cm para los machos y 42.2 cm para las hembras. Así mismo mencionan que las hembras siempre se encontraron en una proporción mayor al 75 % con respecto a la presencia de machos. Esto indica que probablemente la mayoría de los calamares muestreados en el presente estudio durante los meses de diciembre y febrero, fueran organismos maduros, ya que las medianas de LM se encontraron por encima de los valores de L_M50 % reportados por Hernández-Herrera *et al.* (1996) tanto para machos como para hembras, mientras que los capturados en los meses de mayo y junio probablemente fueron organismos inmaduros, dado que las medianas de LM se encontraron por debajo del L_M50 % reportado por los autores.

Composición Química del Manto de Calamar

Los dos componentes principales del manto de calamar fueron agua y proteína cruda los cuales constituyeron el 98.5 % de la composición muscular. Los valores promedios de humedad y proteína cruda de los mantos de calamar de los diferentes muestreos realizados fue de 82.4±2.7 y 16.1±2.5 % respectivamente. En menor proporción, los mantos estuvieron constituidos por 1.2±0.2 % de ceniza, 0.5±0.3 % de grasa y 1.1±0.04 % de NNP. La composición proximal del músculo de calamar encontrada en el presente estudio es similar a la reportada por otros autores (Ramírez-Suárez *et al.*, 2008; De La Fuente-Betancourt *et al.*, 2009; Cortés-Ruíz *et al.*, 2008; Campo-Deaño *et al.*, 2010).

Con respecto a la temporada de muestreo, se observó una fuerte variación del contenido de humedad del manto de calamar (Figura 12), reduciéndose constantemente desde 84.9 % en diciembre hasta 78.6 % en junio. En este sentido, los mantos de los calamares capturados en diciembre y febrero presentaron un promedio mayor ($p \leq 0.05$) del contenido de humedad con respecto a los organismos capturados en mayo y junio, e incluso dentro de este mismo grupo de detectaron diferencias significativas, siendo mayor ($p \leq 0.05$) el contenido de humedad en los organismos de mayo con respecto a los junio.

Por otra parte, el contenido de grasa y ceniza del músculo fue mayor ($p \leq 0.05$) en el mes de junio con respecto a diciembre y febrero (Figura 12), lo que pudiera deberse al incremento proporcional de los componentes por el decremento de la humedad del músculo.

Es importante remarcar que la reducción del contenido de humedad del músculo coincide con el incremento del contenido de proteína. La Figura 13 muestra el análisis de correlación entre estos dos parámetros, así como la ecuación generada. Según el coeficiente de determinación obtenido (r^2=0.97), la variación del contenido de humedad explica el 97 % de la variación del contenido de proteína del músculo. Esta estrecha dependencia podría ofrecer una ventaja

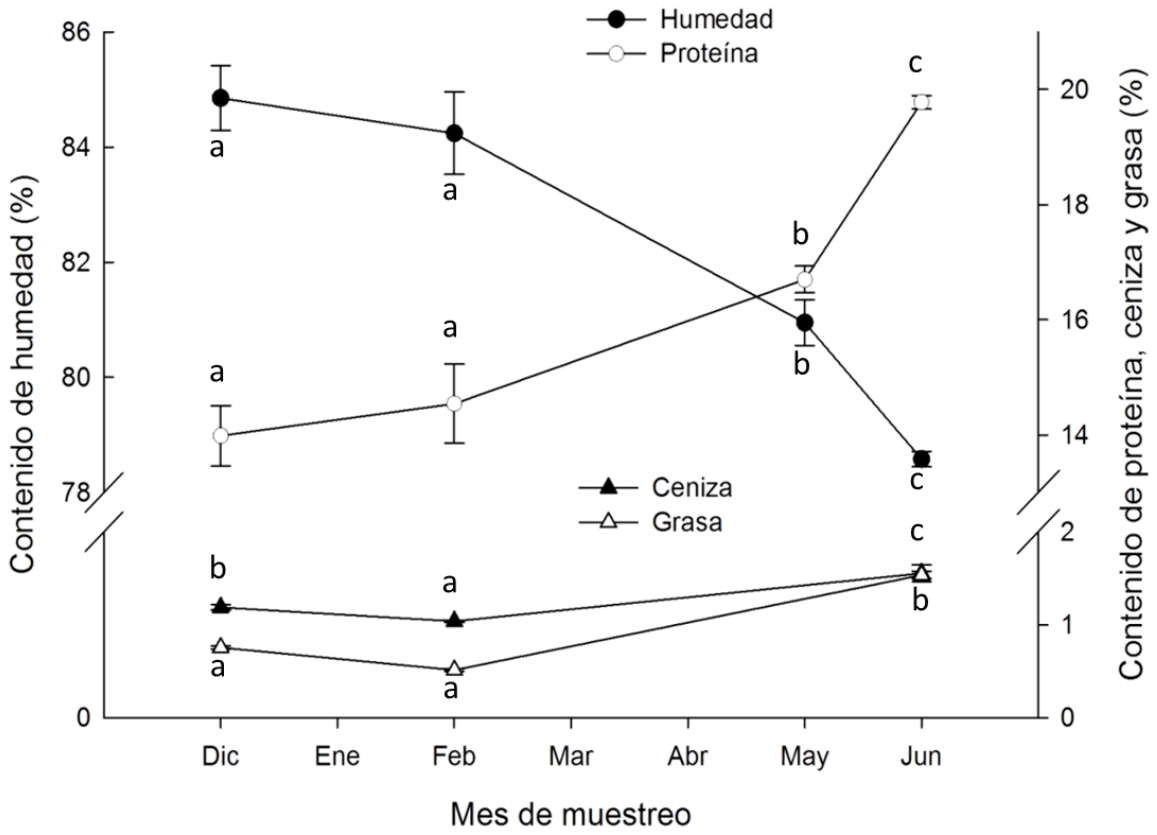

Figura 12. Composición químico-proximal del músculo de calamar gigante por muestreo. Literales diferentes dentro de los puntos unidos por la línea continua muestran diferencias significativas (p≤0.05).

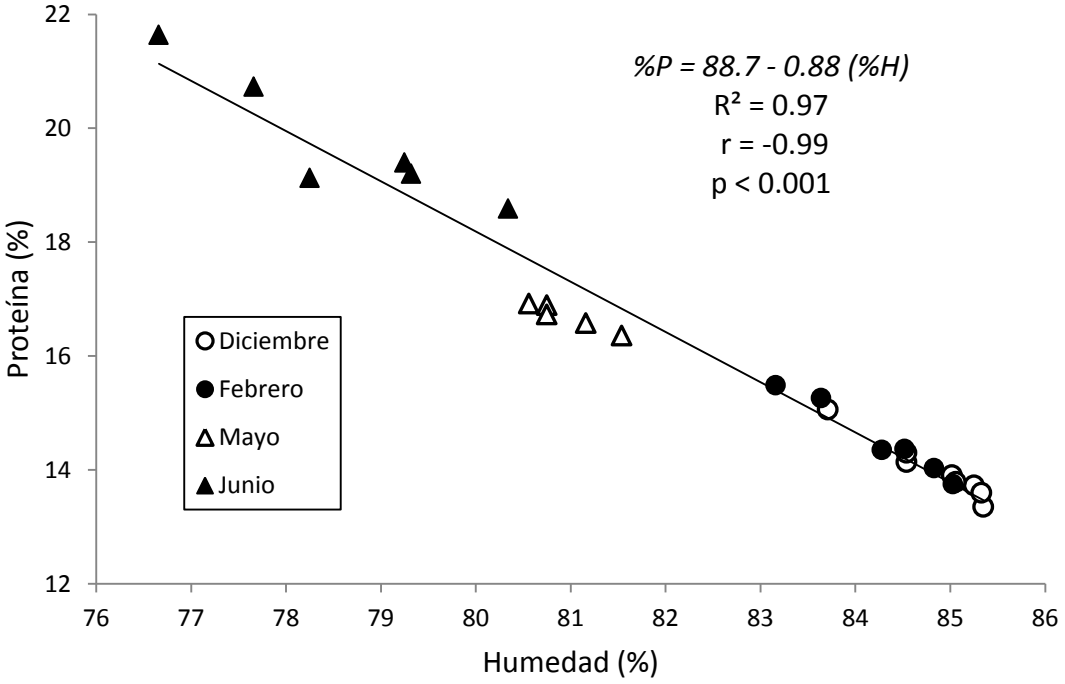

Figura 13. Análisis de correlación entre el contenido de humedad y proteína cruda del músculo de calamar gigante. %P: porcentaje de proteína cruda; %H: porcentaje de humedad.

tecnológica ya que fue posible generar una ecuación (Figura 13) que estime el contenido de proteína en función del contenido de humedad.

Las diferencias en la composición química del calamar pueden estar asociadas a la alimentación y ciclo reproductivo de la especie (entre otros factores), ya que estos dos factores están relacionados estrechamente a la composición química de los productos pesqueros (Huss *et al.*, 1998). En forma general podemos indicar que los calamares obtenidos en invierno eran organismos adultos probablemente en etapa de reproducción y/o desove, mientras los organismos obtenidos en verano eran organismos inmaduros probablemente en etapa de crecimiento. Bazzino *et al.* (2007) exponen que el calamar gigante durante el desove migra grandes distancias a diferentes zonas del Golfo de California. Esta migración puede consumir las reservas proteicas del organismo debido a sus reducidas reservas de grasa (Figura 12), lo que podría explicar el mayor contenido de proteína de los organismos capturados en verano. No obstante, es necesario realizar más investigación al respecto.

Curva de Congelación

El monitoreo de la evolución de la temperatura registrada tanto en la cámara de congelación, como en el músculo de calamar gigante se muestran en la Figura 14. La evolución de la temperatura contra el tiempo del músculo de calamar durante la congelación por convección es congruente a las reportadas por Magnussen *et al.* (2008) para bloques de pescado y por Kolbe (2005) para bloques de surimi.

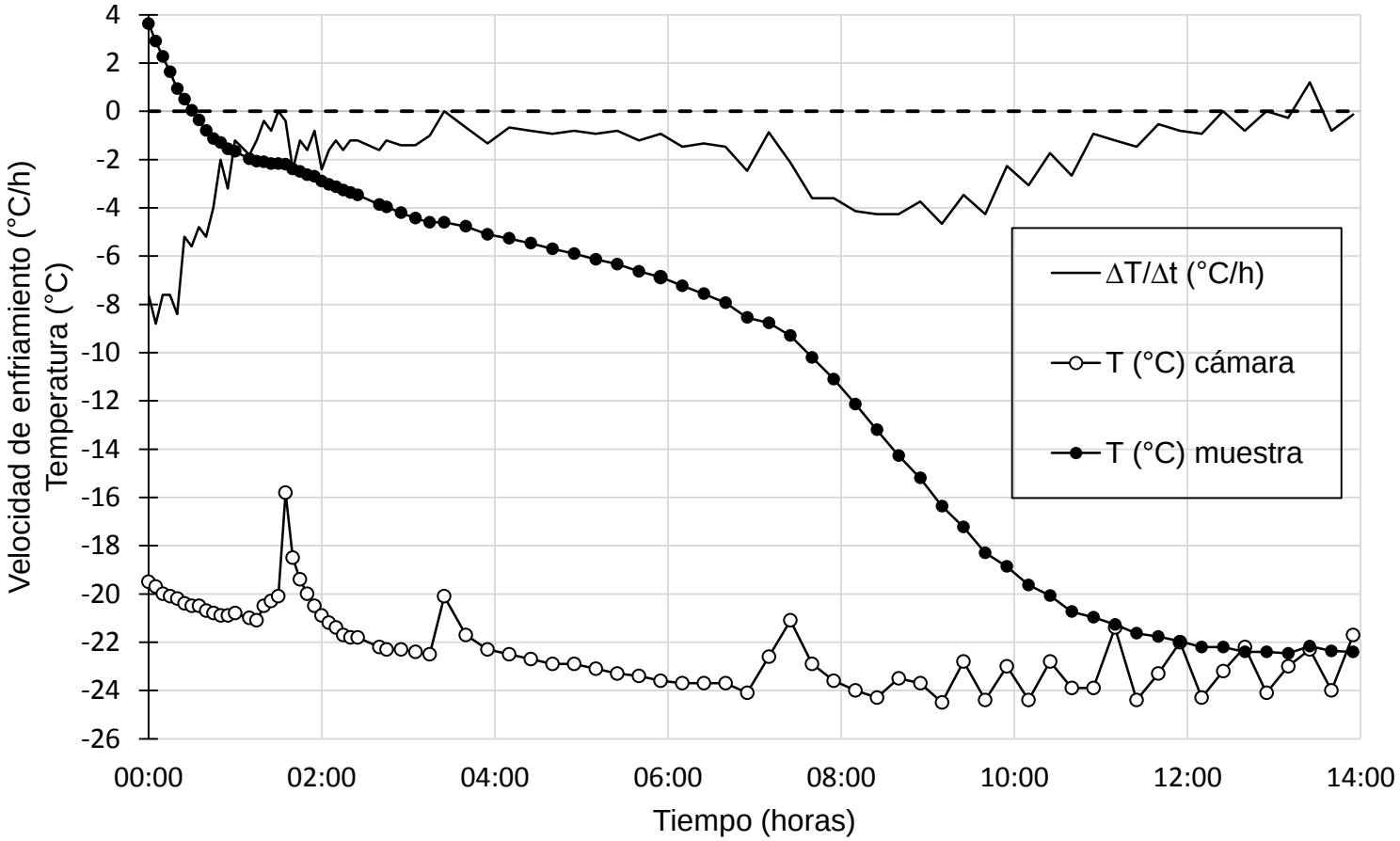

Figura 14. Curva de congelación del músculo de calamar gigante por convección de aire a -20 °C.

Inicialmente, se dio un decremento en la temperatura del músculo desde 4 a -2 °C, que es la temperatura de inicio de congelación del músculo. En este intervalo se dio la reducción de la velocidad de enfriamiento ($\Delta T/\Delta t$) desde -8 a -2 °C/h. En el punto de congelación (-2 °C), se mantuvo la temperatura constante por aproximadamente 20 minutos debido a que todo el calor que se retiró del músculo era calor latente. A este periodo se le conoce como "parada térmica". La reducción de la temperatura a través de la zona de máxima nucleación (desde el punto de congelación hasta los -5 °C) tomó 165 min. Carvajal *et al.* (2005) mencionan que se puede considerar como una "congelación lenta" cuando el centro térmico del producto pasa por esta zona de temperatura en más de 70 min.

A -5 °C, aproximadamente el 80 % del agua se encuentra en forma de hielo. En la Figura 14 se observa que después de -5 °C, el $\Delta T/\Delta t$ se mantuvo relativamente constante a -1 °C/h hasta alcanzar los -8 °C. En esta zona de temperatura el calor liberado provoca la formación de hielo (calor latente) y reducción de la temperatura (calor sensible) simultáneamente (Walstra, 2002). A temperaturas menores de los -8 °C se incrementó el $\Delta T/\Delta t$ (-4 °C/h) debido a que la mayor parte del calor retirado es calor sensible. En el intervalo de -18 a -20 °C se redujo el $\Delta T/\Delta t$ constantemente por la estabilización de la temperatura del músculo con respecto a la del aire de la cámara de congelación. En general, se pueden observar ligeras fluctuaciones de temperatura de la cámara de durante el proceso de congelación (-22 ± 1.7 °C). El proceso de congelación desde -2 °C a -20 °C tomo 9 horas y 15 minutos.

Variación en la Composición Química de los Geles y pH del Músculo

Es bien conocido que el perfil de textura y CRA de geles elaborados a partir de músculo se ven afectados fuertemente por la composición química y pH (Sun y Holley, 2011; Totosaus *et al.*, 2002). Por esa razón, se avaluaron estas variables

en los geles de calamar elaborados. En la Tabla 4 se muestran los valores de humedad y proteína de los geles, así como los valores de pH del músculo por tratamiento (F, MC1, EC1, MC30 y EC30) de cada muestreo de esta etapa (diciembre y mayo). Los datos se discutirán en forma separada.

Variación de la Composición Química con Respecto a la Temporada de Captura

Los resultados indican que se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$) entre los meses de diciembre y mayo para las variables de humedad, proteína y pH (Tabla 4).

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, todos los soles elaborados fueron ajustados a un 80 % de humedad previo a su gelificación. Los valores registrados para los geles elaborados con manto de calamar capturado en el mes de diciembre oscilaron entre 78.2 % a 79.1 % de humedad, mientras que para el mes de mayo los valores de humedad en los geles oscilaron entre 79.0 % y 80.2 %. Esta ligera pérdida de humedad se debe a que durante el proceso térmico los geles de calamar perdieron agua (perdida por cocción), debido a las modificaciones de las interacciones proteína-agua y proteína-proteína que tienen lugar durante la gelificación (Lanier *et al*., 2005).

Por otro lado se observa (Tabla 4) que el contenido de humedad de los geles hechos en diciembre fue menor ($p \leq 0.05$) con respecto a los de mayo para los tratamientos F, MC1 y EC1. Esto es consistente con el contenido de proteína, donde se observó que los geles de calamar de la temporada de mayo tuvieron un mayor ($p \leq 0.05$) contenido de proteína con respecto a los de diciembre. Así mismo, se observaron diferencias marcadas ($p \leq 0.05$) en el pH del músculo de calamar capturado entre los muestreos de diciembre y mayo.

Tabla 4. Contenido de humedad y proteína cruda de geles y valores de pH del músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C por muestreo.

		Diciembre (n=8)			Mayo (n=5)		
		Humedad (%)	**Proteína (%)**	**pH**	**Humedad (%)**	**Proteína (%)**	**pH**
	F	78.9	14.3	6.78	79.6 *	15.8 *	6.08 *
Día 1	**MC**	78.5	14.6	6.71	79.8 *	15.8 *	6.07 *
	EC	78.2	14.8	6.74	80.2 *	15.5 *	6.05 *
Día 30	**MC**	79.1	15.9	6.70	79.1	15.9	6.02 *
	EC	79.1	16.3	6.71	79.0	16.1	6.01 *
Contrastes Ortogonales (valor de p)							
C1: Congelación		0.02	NS	NS	0.04	NS	NS
C2: Molienda		NS	NS	NS	NS	NS	NS
C3: Tiempo		<0.01	<0.001	NS	<0.001	<0.01	NS
DEM		0.6	0.7	0.15	0.4	0.2	0.11

Músculo fresco (F), molido congelado (MC) y entero congelado (EC); Contrastes ortogonales: C1 (F vs EC1), C2 (MC1, MC30 vs EC1, EC30) y C3 (EC1, MC1 vs EC30, MC30). DEM: Desviación estándar de la media. NS: No significativo ($p>0.05$). El asterisco (*) denota diferencias ($p\leq0.05$) con respecto al mes de diciembre dentro de una misma variable y tratamiento.

El mayor contenido de proteína presente en los geles realizados con manto del muestreo de mayo con respecto al de diciembre esta probablemente influenciado por la composición de la materia prima (Figura 12). Los mantos de calamar obtenidos en mayo tenían menos humedad (81.0 %) que los obtenidos en diciembre (84.9 %), de manera que fue necesario adicionar a la formulación de los geles de estos últimos, alrededor de un 3.6 % de azúcar para ajustar el contenido de humedad al 80 %, mientras que para los geles de calamar obtenidos en mayo, no se ajustó el contenido de humedad con azúcar, sino con agua, ya que el contenido de humedad fue menor al 80 %. Por lo que la adición de azúcar provocó la disminución proporcional del contenido de proteína presente en los geles de calamar obtenidos en diciembre.

Por otro lado, los valores de pH encontrados en el músculo de calamar obtenido en mayo oscilaron en el rango de 6.0-6.1. Estos valores son similares a los reportados por Ramírez-Suárez *et al.* (2008) y Márquez-Ríos *et al.* (2007) quiénes reportaron valores de pH en un rango de 6.0-6.2 en manto de calamar gigante almacenado en hielo por un periodo de más de 3 días.

Por otro lado, los valores de pH del músculo de calamar obtenido en diciembre, fue aproximadamente 0.7 unidades mayor con respecto al calamar capturado en mayo (Tabla 4). Dublán-García (2005) reporta valores de pH de alrededor de 6.7 al inicio del almacenamiento del músculo de calamar gigante, aunque en este estudio no se establece la fecha ni zona de captura. Por otro lado, Atayeter y Ercoşkun (2011) reportan valores de pH entre 6.6 y 6.9 en músculo de calamar *Loligo vulgaris.*

La marcada variación de pH con respecto a la temporada de muestreo detectada en el presente estudio, parece ser inusual en el musculo de calamar, por lo que se hace necesario realizar estudios en los que se monitoree el pH presente en el manto de calamar gigante y se correlacione con factores que pudieran influir en su variabilidad, como la formación de metabolitos, tamaño del organismo, estado de madurez, composición, fecha de captura, etc.

Variación en la Composición Química Debido a la Congelación.

Como se mencionó anteriormente, el manto de calamar obtenido de los diferentes muestreos fue manejado fresco (F) y bajo 2 condiciones de almacenamiento, molido congelado (MC) y entero congelado (EC). En la Tabla 4, se muestra la composición química de los geles hechos a partir de músculo fresco y congelado.

Se observa que los geles presentaron diferencias ($p \leq 0.05$) en el contenido de humedad (contraste C1 y contraste C3) y proteína (contraste C3) para ambas temporadas. En este sentido, el contenido de proteína de los geles elaborados a partir de músculo de calamar congelado durante 30 días (MC30 y EC30) fue mayor ($p \leq 0.05$) con respecto a los congelados durante 1 día (MC1 y EC1). El mismo efecto se observó en ambas temporadas. Este efecto se puede deber a la pérdida de humedad por goteo de la materia prima previo a la elaboración de los geles, de manera que al hacer el ajuste de humedad de los soles al 80 % fue necesario adicionar menos azúcar con respecto a los otros tratamientos (F, MC1 y EC1), lo que se vio reflejado en un mayor contenido de proteína de los geles.

Por otro lado, no se observaron ($p > 0.05$) variaciones de pH por efecto de la congelación, estado de la materia prima o tiempo de almacenamiento, probablemente debido al corto periodo de almacenamiento en congelación. Atayeter y Ercoşkun (2011) reportan un incremento constante de los valores de pH en músculo de calamar *Loligo vulgaris* durante su almacenamiento en congelación por 12 meses a diferentes temperaturas de almacenamiento (-20 °C, -40 °C y -80 °C), observándose que el incremento es más acelerado a temperaturas más altas (-20 °C).

Durante el almacenamiento en refrigeración del músculo de calamar, sucede un decremento inicial del pH debido a reacciones bioquímicas promovidas por enzimas endógenas durante el rigor mortis (Márquez-Ríos *et al.*, 2007) y un posterior incremento debido a reacciones promovidas por microorganismos (formación de aminas y degradación de trimetilamina) (Dublán-García *et al.,* 2006). Sin embargo, durante la congelación del producto, estas reacciones ocurren a

velocidades muy bajas de modo que los cambios post-mortem que suceden en días durante la utilización de temperaturas de refrigeración, pueden llevar meses durante el almacenamiento en congelación.

Efecto de la Congelación Sobre la Capacidad Gelificante

En esta sección, se muestran los resultados de los muestreos de diciembre y mayo separadamente. Esto se realizó debido a la gran variabilidad encontrada en la materia prima, lo que influyó en la funcionalidad de la misma e incrementó consecuentemente los coeficientes de variación entre tratamientos.

Como se mencionó previamente, se encontraron diferencias ($p \leq 0.05$) en el contenido de humedad y proteína de los geles por efecto de la congelación y almacenamiento (contrastes C1 y contrastes C3) en ambos muestreos. Sin embargo, sólo el contenido de proteína fue considerado como covariable para el análisis de varianza de los datos obtenidos del Análisis de Perfil de Textura (APT), Prueba de Doblado (PD) y Capacidad de Retención de Agua (CRA) debido a que sólo el contenido de proteína presentó una correlación significativa ($p \leq 0.05$).

Los parámetros del APT, PD y CRA de los geles elaborados en diciembre y mayo se muestran en la Figura 15 y en la Tabla 5. En ambos casos, sin importar la temporada en la que fue capturado el calamar, no se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en ninguno de los tres contrastes realizados. Este resultado fue el mismo para todas las variables evaluadas.

Los valores de dureza, elasticidad y cohesividad oscilaron entre los 850-900 gf/g, 46.5-50.0 % y 27.5-30.0 % para el mes de diciembre, respectivamente; y entre 700-800 gf/g, 39.5-45.0 % y 28.0-30.0 % para el mes de mayo, respectivamente (Figura 15). En base a estos resultados, se puede observar que los geles de

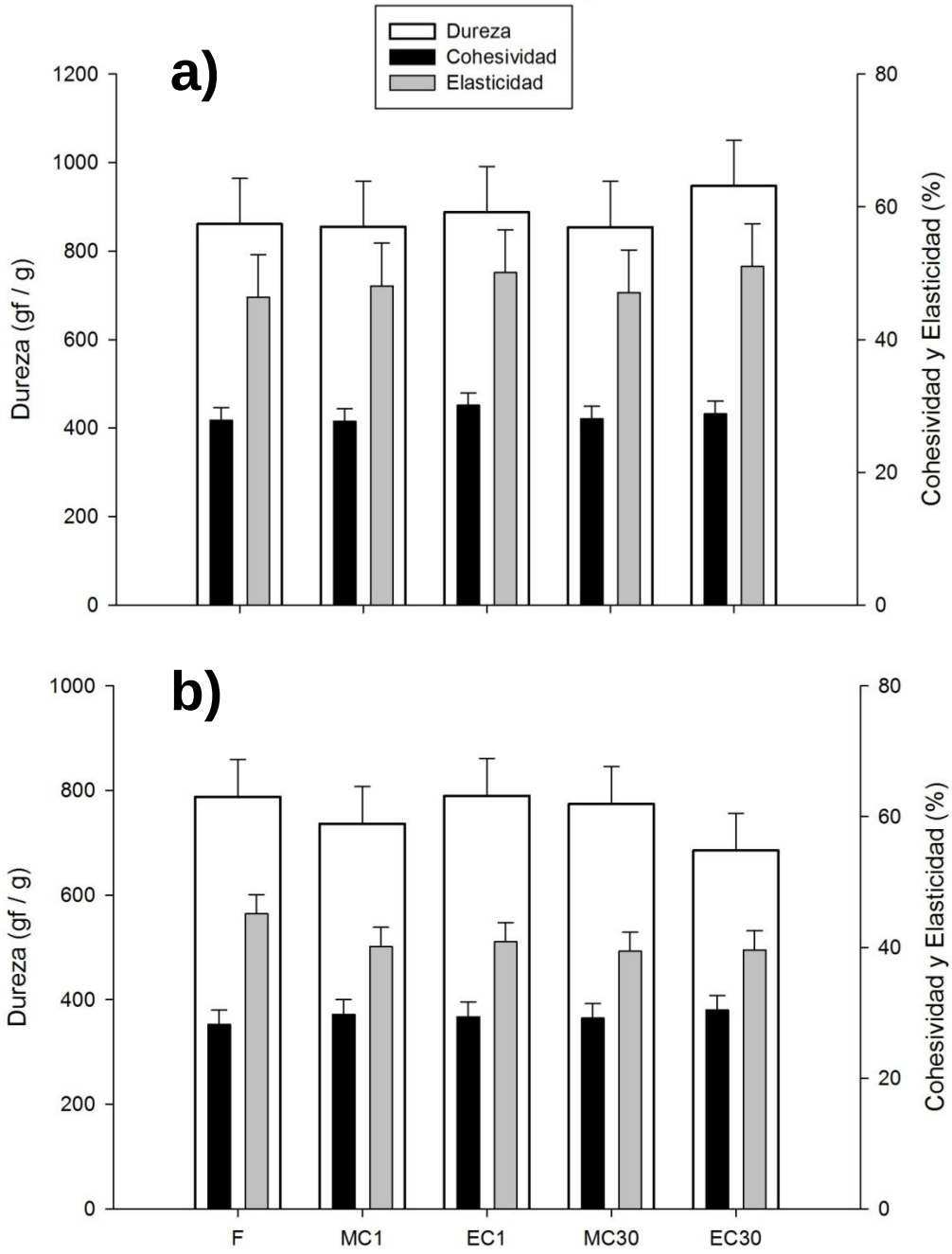

Figura 15. Análisis de perfil de textura (APT) de los geles de músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C. a) Muestreo de diciembre (n=8); b) Muestreo de mayo (n=6). No se encontraron diferencias significativas (p>0.05). Músculo fresco (F), molido congelado (MC) y entero congelado (EC). 1 y 30: días de almacenamiento.

Tabla 5. Prueba de doblado (PD) y capacidad de retención de agua (CRA) de los geles de músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C

		Diciembre (n=8)			Mayo (n=6)		
		PD (1-5)	**CRA-1** (%)	**CRA-2** (g_{H_2O} / $g_{proteína}$)	**PD** (1-5)	**CRA-1** (%)	**CRA-2** (g_{H_2O} / $g_{proteína}$)
	F	3.6 (A-B)	92.0	4.9	2.9 (B-C) *	96.2 *	4.8
Día 1	**MC**	3.4 (A-B)	92.1	4.8	2.5 (B-C) *	94.4	4.8
	EC	3.8 (A-B)	91.9	4.8	2.6 (B-C) *	95.4 *	4.8
Día 30	**MC**	3.4 (A-B)	90.1	4.8	2.4 (B-C) *	94.0	4.7
	EC	3.6 (A-B)	91.0	4.8	2.5 (B-C) *	94.0	4.7
DEM		0.4	1.6	0.1	0.6	1.9	0.1

Músculo fresco (F), molido congelado (MC) y entero congelado (EC); DEM: Desviación estándar de la media. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$). El asterisco (*) denota diferencias ($p\leq0.05$) con respecto al mes de diciembre dentro de una misma variable y tratamiento. Entre paréntesis: Calificación nominal de la prueba de doblado.

calamar capturado en diciembre tuvieron mejor calidad con respecto a los de mayo, ésto en términos de dureza y elasticidad ($p \leq 0.05$). Estos resultados son similares a los reportados por Ramírez-Suárez *et al.*, (2008), quienes reportaron valores similares de dureza (600-900 gf/g) y cohesividad (22.5-30.4 %), aunque mayores de elasticidad (60-84 %) en músculo de calamar gigante almacenado en hielo.

Estos resultados demuestran que las características de calidad de los geles elaborados a partir de calamar congelado son similares a los elaborados a partir de calamar fresco, independientemente del estado de la materia prima o el tiempo de almacenamiento ($p > 0.05$) (Figura 15). Gómez-Guillén *et al.* (2003) reportaron un incremento de la capacidad gelificante del músculo de calamar *Loligo vulgaris* almacenado a -20 °C, en términos del módulo de elasticidad (G') y módulo de viscosidad (G''). Sin embargo, son escasos los estudios que evalúen el efecto de la congelación sobre la capacidad gelificante del calamar o de moluscos, ya que la mayoría de los estudios están enfocados a la evaluación de propiedades funcionales como la solubilidad, viscosidad y capacidad emulsificante (Tabla 2).

Así pues, los resultados obtenidos de la capacidad gelificante del músculo congelado difieren a lo reportado en otros estudios, donde se ha demostrado que la congelación tiene un efecto negativo sobre la capacidad gelificante del músculo de pescado. Benjakul *et al.* (2005) reportaron que la fuerza de ruptura (dureza) y deformación (elasticidad) de geles de músculo congelado de cuatro especies diferentes de pescado, sufrieron un decremento de hasta un 43.8 y 71.8 % respectivamente, comparado con el músculo fresco, especialmente al inicio de la congelación. Estos autores atribuyen que las diferencias en la reducción de capacidad de formar geles del músculo congelado de las diferentes especies, se deben a diferencias en la estabilidad de las proteínas durante la congelación y al almacenamiento en congelación.

El daño por congelación se atribuye a la formación de agregados. Esto ocurre debido a que durante la congelación las proteínas se desnaturalizan provocando la exposición grupos hidrofóbicos, grupos sulfhidrilos y otros grupos reactivos que

pueden interaccionar entre cadenas laterales de proteína para formar agregados (Park, 1994). Estos agregados son difíciles de disociar durante el proceso de extracción de las proteínas durante la elaboración del sol, y de esta manera no es posible formar una dispersión proteica homogénea, que es un pre-requisito para la formación de una red tridimensional ordenada durante el tratamiento térmico, lo que conlleva a la reducción de la funcionalidad (Lanier *et al.,* 2005). Además, la formación de estos agregados reduce la disponibilidad de los grupos reactivos que son importantes para la formación de geles fuertes y cohesivos (Benjakul *et al.,* 2005).

Ganesh *et al.* (2006) reportaron una reducción de aproximadamente 20 y 40 % de la fuerza de geles de carpa en los primeros 30 y 60 días de almacenamiento a -18 °C, respectivamente. En el presente estudio, los valores de dureza de los geles de músculo de calamar hechos después de 1 día y 30 días en congelación fueron similares ($p>0.05$) (Figura 15), lo que parece indicar que la disponibilidad, cantidad de interacciones y/o tamaño de los agregados de las cadenas proteicas formados durante la gelificación no varía por la congelación. Sin embargo, se requiere más investigación para demostrar esto.

Los valores de cohesividad, elasticidad y PD, no mostraron diferencias ($p>0.05$) debido a la congelación, tiempo de almacenamiento y molienda de la materia prima (Tabla 5 y Figura 15). La cohesividad, elasticidad y PD, son pruebas que dan información acerca de la calidad de las interacciones proteína-proteína de los geles; proteínas que tienen la capacidad de formar interacciones intermoleculares fuertes y matrices ordenadas durante la gelificación, son capaces de formar geles más elásticos y cohesivos (Sun y Holley, 2011; Totosaus *et al.*, 2002).

MacDonald *et al.* (1990) reportaron diferencias en la reducción de la cohesividad de geles de merluza (*Macruronus novaezelandiae*) dependiendo si la materia prima fue congelada (-20 °C) entera, molida o molida-estabilizada (con 12 % de sacarosa). La reducción aproximada de la cohesividad de los geles después de la congelación durante 1 y 3 meses fue de un 7 y 14 % para el músculo entero, 28 y 64 % para el músculo molido y de sólo 1.8 y 3.5 % para el músculo molido-

estabilizado, respectivamente. Estos autores mencionan que las diferencias en la pérdida de cohesividad de los geles de merluza se debieron a diferencias en la producción de formaldehido (FA) durante el almacenamiento. La cantidad de FA fue más elevada en el músculo molido y congelado sin estabilizantes, correlacionándose con la mayor pérdida de cohesividad. Esto lo atribuyen a que la molienda provoca la ruptura de los organelos celulares donde se encuentra la enzima OTMA demetilasa, que es la responsable de catalizar la formación de FA durante la congelación. En este sentido, la adición de sacarosa permitió que la cohesividad se mantuviera por la inhibición de la enzima OTMA demetilasa, lo cual se ha reportado en otros estudios (Leelapongwattana *et al.*, 2008; Herrera *et al.*, 1999).

En el presente estudio no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en la cohesividad entre los geles hechos de músculo MC y EC. Estos resultados parecen indicar que el músculo de calamar no requiere de estabilizantes para su congelación, ya que *per se* mantiene la cohesividad de los geles. Esto podría deberse a dos razones: 1) que la enzima OTMA demetilasa tiene poca actividad a la temperatura de almacenamiento de este estudio ó 2) que el músculo de calamar posee compuestos que inhiben la actividad de dicha enzima.

Castellanos y Hernández (2005) reportaron que no hay incrementos en la formación de formaldehido en calamar después de 8 meses de almacenamiento a -20 °C (<5mg de FA / g de músculo), mientras que el almacenamiento a -10 °C, provoca un incremento dramático después del segundo mes (desde 2 hasta casi 40 mg de FA / g de músculo).

A pesar de lo anterior, la hipótesis de una baja actividad de la enzima OTMA demetilasa o de su inhibición involucra sólo un factor que afecta la funcionalidad de las proteínas durante la congelación, por lo que en estudios futuros es necesario considerar otros factores importantes.

La CRA está directamente relacionada con el tipo y carga de las proteínas de la matriz en el gel formado (Puppo *et al.*, 1995). Geles con estructuras ordenadas

poseen una CRA alta, mientras que geles con una estructura agregada, desordenada y abierta, carecen de capacidad de retención de agua (Avanza *et al.*, 2005). Gómez-Guillén *et al.* (1997) encontraron diferencias en la estructura de geles de sardina debido a la congelación y almacenamiento en congelación, cuyo efecto se incrementó cuando se utilizaron velocidades de congelación lenta y temperaturas de almacenamiento altas. Estas condiciones provocaron que las proteínas formaran una matriz estructuralmente agregada, con espacios abiertos y con una menor CRA con respecto al músculo fresco.

En el presente estudio, los valores de CRA (Tabla 5) no mostraron diferencias ($p>0,05$) debido a la congelación, molienda y tiempo de almacenamiento, obteniéndose valores de CRA que oscilaron entre 90-92 % y 94-96 % de agua retenida en relación con el agua total (CRA-1) para los muestreos de diciembre y mayo, respectivamente; y entre 4.7-4.9 gramos de agua retenida por gramo de proteína (CRA-2) para ambos muestreos. Esto podría deberse a que la naturaleza estructural de los geles formados de calamar no se vio afectada por la congelación del músculo bajo las condiciones probadas y que las proteínas probablemente no sufren una agregación severa que afecte la CRA a pesar de las condiciones drásticas de almacenamientos, las cuales incluyen una congelación lenta (proceso de más de 9 horas), una temperatura de almacenamiento relativamente alta (-20 °C) y el almacenamiento del músculo molido.

Efecto de la Congelación y Temporada de Captura

En general se observó que la capacidad gelificante del músculo de calamar obtenido en diciembre fue superior al de mayo en términos de dureza, elasticidad y PD (Figura 15 y Tabla 5), a pesar de que los geles hechos en mayo presentaron alrededor de un 2 % más proteína para el músculo F, MC1 y EC1 (Tabla 4). Lo anterior se discute a continuación.

Si expresamos la dureza de gel obtenida por gramo de proteína ($Dureza\ (kgf/g)/Proteína\ (\%)\ X\ 100$), encontramos que los geles de calamar elaborados en el mes de diciembre fueron más duros ($p \leq 0.05$) con respecto a los de mayo, con valores de 5.5 y 4.8 kgf / $g_{proteína}$, respectivamente; es decir, los geles de calamar de diciembre mostraron 15 % más dureza de gel por unidad de proteína con respecto a mayo. Así mismo, los geles elaborados en diciembre mostraron ser 18 % más elásticos ($p \leq 0.05$). A través de la prueba de doblado (Tabla 5), se evidenció la superioridad funcional de los geles de calamar de diciembre, con valores cerca de 1 unidad mayor (de A-B a B-C) con respecto a los geles obtenidos en mayo ($p \leq 0.05$).

A diferencia del calamar del mes de diciembre, en mayo se observó una tendencia no significativa ($p > 0.05$) hacia la reducción de las variables de elasticidad y PD (Figura 15 y Tabla 5) en el músculo congelado (MC1, EC1, MC30 y EC30). Esta característica podría estar relacionada con el hecho de que el músculo de calamar presentó 3 diferencias importantes entre el muestreo de diciembre y mayo: 1) el tamaño de los organismos (siendo grandes en diciembre y pequeños en mayo), presentándose probablemente diferencias en el estado de madurez; 2) el pH del músculo (6.7 / 6.0); y la calidad inicial de la materia prima (calidad gelificante superior en diciembre).

Cabe enfatizar que el efecto de la congelación sobre la capacidad gelificante del músculo capturado en el mes de mayo es sólo tendencioso más no significativo ($p > 0.05$) (Figura 15 y Tabla 5), Sin embargo, los factores antes mencionados

(tamaño, pH y calidad proteica) podrían considerarse para estudios posteriores donde se apliquen condiciones de congelación más severas y tiempos de almacenamiento más prolongados.

Efecto de la Congelación Sobre la Desnaturalización y Agregación de las Proteínas Musculares

La agregación de las proteínas antes de su procesamiento térmico reduce la subsecuente habilidad de éstas para formar un gel de buena calidad (Carvajal *et al.*, 2005). La agregación prematura de las proteínas musculares puede ocurrir normalmente durante la captura, manejo y procesamiento, pero especialmente durante la congelación y almacenamiento en congelación (Park, 1994).

En el presente estudio, la evaluación de las proteínas mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (CDB) e hidrofobicidad de superficie (SoANS), se utilizaron como herramientas para monitorear los cambios de desnaturalización-agregación de las proteínas del músculo de calamar. Esto, con la finalidad de observar como los cambios a nivel estructural afectan a la capacidad gelificante de las proteínas del músculo.

Para esta etapa fueron utilizados los organismos de los muestreos realizados en los meses de febrero y junio. Sin embargo, sólo se muestran los resultados del muestreo del mes de junio debido a que los organismos del mes de febrero se utilizaron para realizar sólo estudios preliminares.

Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB)

La desnaturalización inducida por calor involucra una transición cooperativa o no-cooperativa de la proteína desde su estado replegado a su estado no-replegado. Esto se relaciona con la desorganización de la estructura tridimensional de la molécula nativa. El desdoblamiento cambia las interacciones de la proteína con el medio acuoso e induce agregación de las moléculas de proteína desplegadas. Los efectos térmicos de la desnaturalización y agregación de las proteínas son usualmente pequeños y de signo opuesto, esto es, de absorción (endotérmico) y liberación (exotérmico) de calor (Grinberg *et al.*, 2009).

La CDB es una herramienta que ha sido ampliamente utilizada para monitorear los cambios de desnaturalización de las proteínas miofibrilares por efecto de la congelación y almacenamiento en congelación (Matos *et al.*, 2011; Kovačević y Mastanjević, 2011; Hurling, y McArthur, 1996; Paredi *et al.*, 1996; Davis *et al.*, 1994; Howell *et al.*, 1991; Hastings *et al.*, 1985).

Los termogramas obtenidos mediante CDB del músculo de calamar gigante fresco se muestran en la Figura 16. Como se puede observar, las proteínas del músculo de calamar presentan 4 picos de transición endotérmicos, con valores de T_{max} promedio de 47.6±0.5 °C (Pico I), 61.3±0.5 °C (Pico II), 68.9±0.5 (Pico III) y 78.3±0.4 °C (Pico IV). Resultados similares a los del presente estudio fueron reportados por Paredi *et al.* (1996) quienes obtuvieron 4 picos de transición endotérmicos con valores de T_{max} de 45.9, 56.8, 67.2 y 79.2 °C a partir de músculo fresco de calamar *Illex argentinus*. Estos autores demostraron que los picos de transición endotérmicos se debe a la desnaturalización de la actomiosina (Pico I y IV), tejido conectivo (Pico II) y proteínas sarcoplásmicas (Pico I, III y IV). En el presente estudio se encontró que la T_{max} de los picos de transición son mayores en el músculo de *Dosidicus gigas* con respecto al de *Illex argentinus* (a excepción del pico IV), lo cual puede deberse a la temperatura del hábitat (Howell *et al.*, 1991), ya que el calamar gigante habita en aguas tropicales mientras el calamar *Illex argentinus* en aguas frías.

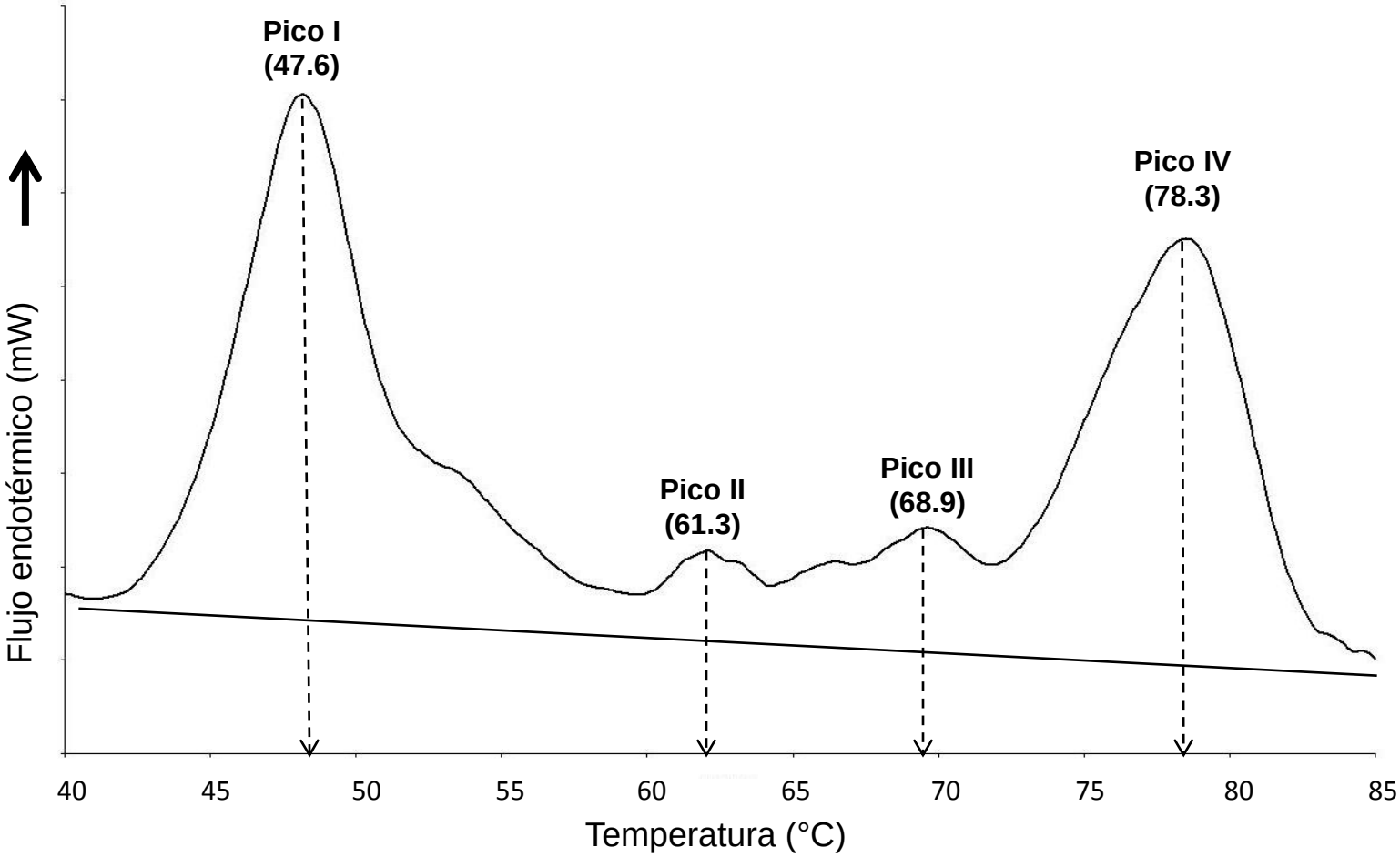

Figura 16. Picos de transición térmica promedio del músculo de calamar gigante fresco obtenidos mediante calorimetría diferencial de barrido. Velocidad de calentamiento: 5 °C/min.

Hastings *et al.* (1985) reportaron termogramas de músculo de calamar *Loligo forbesi*, langostino tigre, bacalao y arenque, con patrones similares a los obtenidos en este estudio. Estos autores demostraron mediante la separación de las proteínas de bacalao que la transición térmica de la miosina y actina corresponden a los picos observados aproximadamente a los 47 y 79 °C respectivamente. Davies *et al.* (1994) atribuyen la aparición de la primera transición térmica a la miosina y la aparición de la transición cerca de los 80 °C a la actina, independientemente de la especies. No obstante, se requiere hacer estudios específicos en proteínas aisladas del músculo de calamar gigante para asociar objetivamente la procedencia de los picos de transición térmica con los diferentes tipos de proteínas del músculo.

De acuerdo a lo anterior, es muy probable que los picos I y IV obtenidos en los termogramas del presente estudio correspondan a los picos de transición térmica de la miosina y actina, respectivamente; por lo que para este estudio asumiremos que los 4 picos de transición térmica encontrados en el perfil calorimétrico del músculo de calamar se deben a:

Pico I: Principalmente miosina
Pico II: Tejido conectivo
Pico III: Proteínas sarcoplásmicas
Pico IV: Principalmente actina

En la Figura 17 y Tabla 6 se muestran los valores de la temperatura (T_{max}) y entalpía de transición (ΔH) de las proteínas del músculo de calamar gigante medidas por CDB. El valor promedio de la T_{max} de la miosina (47.6 °C) del músculo de calamar fue inferior con respecto a la miosina de mamíferos de sangre caliente, como el conejo (60 °C) y res (59 °C), así como también de algunos peces de aguas tropicales, como el bagre (*Clarius gariepinus*) (55 °C), perca (*Lates niloticus*) (56 °C), carpa (*Lutianus sebae*) (54 °C) y besugo (*Gymnocranius rivulatus*) (52 °C). En contraparte, estos valores fueron mayores a la de peces de aguas frías como el arenque (*Clupea harengus*) (43 °C), trucha (*Salmo gairderi*)

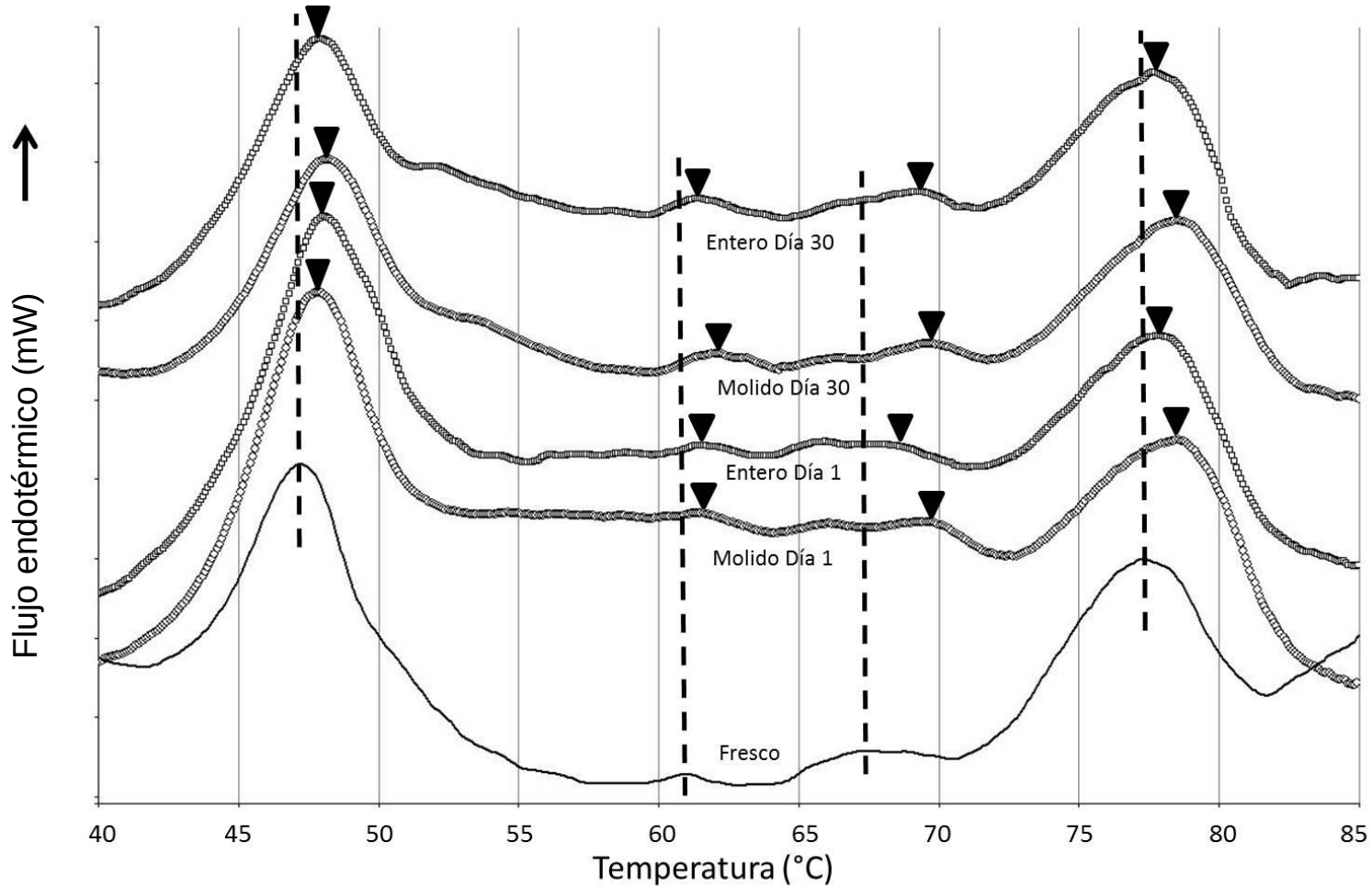

Figura 17. Picos de transición térmica del músculo de calamar gigante fresco y congelado mediante calorimetría diferencial de barrido. Velocidad de calentamiento: 5 °C/min. La línea discontinua (músculo fresco) y los triángulos (músculo congelado) representan la T_{max} de las transiciones térmicas.

Tabla 6. Temperatura (T_{max}) y entalpia (ΔH) de desnaturalización térmica e hidrofobicidad de superficie (SoANS) del músculo de calamar gigante fresco y almacenado en congelación por 1 y 30 días a -20 °C

		Pico I		Pico II	Pico III	Pico IV			
		T_{max}	ΔH	T_{max}	T_{max}	T_{max}	ΔH	ΔH_{total}	So(ANS)
	F	47.4	0.38	61.0	68.2	78.0	0.26	0.70	0.120
Día 1	**MC**	47.5	0.42	61.4	69.0	78.3	0.30	0.76	0.133
	EC	47.7	0.45	61.2	68.7	78.2	0.34	0.83	0.141
Día 30	**MC**	47.6	0.37	61.7	69.5	78.6	0.31	0.71	0.154
	EC	47.7	0.40	61.3	69.2	78.6	0.33	0.76	0.167
Contrastes Ortogonales (valor de p)									
C1: Congelación		NS	<0.001	NS	NS	NS	<0.001	<0.001	<0.001
C2: Molienda		NS	0.05	NS	NS	NS	0.01	<0.01	0.04
C3: Tiempo		NS	<0.001	NS	0.02	0.03	NS	<0.01	<0.001
DEM		0.34	0.03	0.40	0.48	0.35	0.03	0.05	0.011

Músculo fresco (F), molido congelado (MC) y entero congelado (EC); Contrastes ortogonales: C1 (F vs EC1), C2 (MC1, MC30 vs EC1, EC30) y C3 (EC1, MC1 vs EC30, MC30). DEM: Desviación estándar de la media**.** $\Delta H_{total}=\Delta H_{pico\ I}+\Delta H_{pico\ II}+\Delta H_{pico\ III}+\Delta H_{pico\ IV}$. α=0.05. n=6. La T_{max} se expresa en °C y el ΔH en J/g de muestra. La SoANS es adimensional.

(46 °C) y bacalao (*Gardos morhua*) (42 °C) (Howell *et al.*, 1991). Las diferencias de la T_{max} de la miosina del calamar con respecto a otras especies se deben a que existe una correlación positiva entre la T_{max} y la temperatura del hábitat (Howell *et al.*, 1991; Davies *et al*., 1994).

Ramírez-Olivas *et al.* (2004) reportaron valores superiores de la T_{max} de la miosina (49.8-50.8 °C) y actina (78.6-81.0), aunque valores similares para las proteínas sarcoplásmicas (68.6) del músculo de calamar *Dosidicus gigas* almacenado en hielo. Sin embargo, no reportan el pico de transición térmica correspondiente al tejido conectivo. Los valores superiores de la T_{max} reportados por estos autores comparados con los del presente estudio, pueden deberse a diferencias entre organismos debido a la temporada y/o zona de captura (Carvajal *et al.*, 2005), ya que los calamares obtenidos por Ramírez-Olivas *et al.* (2004) fueron capturados en el mes de marzo en la zona de Bahía de Kino, mientras que los calamares obtenidos para el presente estudio se capturaron en junio cerca de la isla Ángel de la Guarda, Baja California.

En la Figura 17 se muestran los termogramas obtenidos del músculo de calamar (F, MC1, EC1, MC30 y EC30). En general, se puede observar que los termogramas de los distintos tratamientos, presentan un patrón similar entre sí, sin observarse cambios aparentes en la naturaleza de las transiciones térmicas. Sin embargo, mediante el análisis de los termogramas se observó que existe una tendencia hacia incrementarse los valores de T_{max} debido a la congelación y tiempo de almacenamiento (Tabla 6), aunque estos incrementos no fueron significativos ($p>0.05$) en la T_{max} de la miosina (pico I) y tejido conectivo (Pico II) debido a la congelación, molienda y tiempo de almacenamiento (contrastes C1, C2 y C3 respectivamente). Por otro lado, las proteínas sarcoplásmicas (pico III) y actina (pico IV) experimentaron un incremento ($p\leq0.05$) en la T_{max} debido al tiempo de almacenamiento en congelación (contraste C3), pero no hubo efecto debido a la congelación o molienda (contrastes C1 y C2).

Los valores de entalpia (ΔH) de la miosina, actina y ΔH_{total} se muestran en la Tabla 6. Los valores de ΔH del pico II y III no se reportan debido a que presentaron una

alta variabilidad (CV > 15 %). Los contrastes C1 y C2 fueron significativos ($p \leq 0.05$) para las variables de ΔH de la miosina, actina y ΔH_{total} del músculo, siendo los valores del músculo entero congelado al día 1 (EC1) mayores ($p \leq 0.05$) con respecto al músculo fresco (contraste C1) y los valores del músculo EC mayores con respecto a los del músculo MC (contraste C2). Los valores de ΔH de la miosina y ΔH_{total} del día 30 en congelación (contraste C3), muestran un decremento ($p \leq 0.05$) con respecto al día 1, mientras los valores de ΔH de la actina no presentaron cambios ($p > 0.05$). Esto indica que existe un incremento del ΔH (miosina, actina y ΔH_{total}) debido a la congelación-descongelación y un decremento del mismo debido al efecto de la molienda y tiempo de almacenamiento.

Existen pocos estudios donde se reporte la estabilidad de la miosina (en términos de T_{max}) del músculo de calamar o moluscos durante la congelación. Paredi *et al.* (1996) no encontraron cambios de la T_{max}, ΔH de la miosina y ΔH_{total} de calamar *Illex argentinus* almacenado durante 9 meses en congelación a -30 °C. Estos resultados son congruentes con los del presente estudio, lo que parecería indicar que la miosina de calamar es estable durante el almacenamiento en congelación, a diferencia de la miosina de pescado. Matos *et al.* (2011) reportaron que la T_{max} de la miosina de músculo de pez dorado no se vio afectada debido a la congelación a -20 °C por 40 días, pero sí después de 2 ciclos de congelación-descongelación.

Generalmente se reporta que la congelación tiene un efecto negativo en la estabilidad térmica de las proteínas de pescado, principalmente de la miosina. Davies *et al.* (1994) reportaron un decremento promedio de 5.2 °C en la T_{max} de la miosina de músculo de bacalao, arenque, perca, pargo, mero, pez conejo y bonito almacenados a -20 °C durante 52-54 semanas. En este mismo estudio, el bacalao y arenque presentaron un decremento de la T_{max} de manera gradual durante el almacenamiento en congelación por 30 semanas. Estos autores mencionan que los peces de aguas frías son aparentemente más susceptibles a la congelación (mayor reducción de la T_{max}) con respecto a los de aguas tropicales.

Srinivasan *et al.* (1997) reportaron un decremento de la T_{max} de langostinos (*Macrobrachium rosenbergii*) principalmente por efecto de la congelación-descongelación; mientras que Kovačević y Mastanjević (2011) reportaron un decremento gradual de la T_{max} de la miosina durante el almacenamiento en congelación de surimi de músculo de res (*m. psoas major*), el cual es retardado por efecto de crioprotectores. La reducción de los valores de T_{max} de la miosina está asociado principalmente a la desestabilización de las interacciones intramoleculares de la proteína, dado que desnaturaliza a una temperatura más baja (Kovačević y Mastanjević, 2011; Howell *et al.*, 1991; Hastings *et al.*, 1985). Establecido que la reducción de la T_{max} indica la desestabilización térmica de la miosina, los resultados obtenidos en el presente estudio revelan que la miosina del músculo de calamar es estable bajo las condiciones del estudio, a diferencia de la mayoría de las especies de pescado.

La medición de la entalpia de desnaturalización (ΔH) es una forma indirecta de estimar la cantidad de proteína nativa (Kovačević y Mastanjević, 2011). Sin embargo, los valores de ΔH pueden variar dependiendo de varios factores como la presencia y concentración de azúcares (Medina-Vivanco *et al.*, 2004), almacenamiento, sexo, estado de madurez (Paredi *et al.*, 1996), pH y fuerza iónica (Howell *et al.*, 1994), entre otros.

El incremento en la ΔH de la miosina observado (Tabla 6) en el músculo de calamar congelado por 1 día (contraste C1) puede deberse a la formación de interacciones intermoleculares durante la congelación. Davis *et al.* (1994) reportaron un incremento en la ΔH de la miosina de bacalao después de 10 semanas de almacenamiento en congelación y hasta el final del almacenamiento (54 semanas). Los autores sugieren hipotéticamente que este incremento se debió a la formación de enlaces cruzados, principalmente vía puentes de hidrógeno. Así mismo, Thawornchinsombut y Park, (2006) reportan incrementos del ΔH de surimi de merluza del pacífico sometido a condiciones severas de congelación.

En este sentido, el músculo de calamar muestra los valores más altos ($p \leq 0.05$) de ΔH de la miosina, actina y ΔH_{total} en el músculo congelado entero por 1 día (EC1),

lo que indica que el proceso de congelación-descongelación provoca un rearreglo molecular que favoreció la formación de interacciones inter y/o intramoleculares que incrementaron la resistencia de las proteínas musculares a desnaturalizarse durante su calentamiento. Estos resultados son diferentes a los reportados en otros estudios y requiere de investigación para evaluar la naturaleza de las interacciones formadas durante la congelación.

Después de 30 días de almacenamiento en congelación, el valor promedio de la ΔH de la miosina y ΔH_{total} sufrieron una reducción ($p \leq 0.05$) relativa de 11.5 % y 7.5 % con respecto al día 1 (contraste C3), respectivamente. A pesar que esta reducción es relativamente pequeña, indica que probablemente se redujo la cantidad de miosina en su estructura nativa (desnaturalizándose) durante el almacenamiento en congelación por 30 días. Por otro lado, la reducción del valor de ΔH de la miosina, actina y ΔH_{total} encontrado en el músculo MC con respecto al EC (Tabla 6), indica que el proceso de molienda aplicado al músculo provoca una parcial desnaturalización de las proteínas durante la congelación, aunque la diferencia relativa es sólo del 7.6, 9.8 y 8.2 %, respectivamente.

Por otro lado, se observó un incremento ($p \leq 0.05$) de la T_{max} de la actina debido al almacenamiento en congelación (contraste C3). En general, es aceptado que la actina del músculo de pescado es más estable durante la congelación que la miosina. El incremento de la T_{max} de la actina encontrado en este estudio es consistente a lo reportado por diversos autores. Howell *et al.* (1991) reportaron aparentes incrementos en la T_{max} de la actina de bacalao, arenque y trucha, mientras Hurling *et al.* (1996) no encontraron cambios en la transición de la actina de bacalao debido a la congelación, recongelación y diferentes condiciones de descongelación. Por otro lado, Matos *et al.* (2011) reportaron un incremento en la T_{max} de la actina después someter al músculo de pez dorado a un doble ciclo de congelación-descongelación a -20 °C. Estos autores mencionan que el incremento en la T_{max} de la actina puede deberse a la agregación de los filamentos de actina o a un efecto de deshidratación.

Al igual que el ΔH de la miosina, el ΔH de la actina sufrió un incremento debido al efecto de la congelación-descongelación del músculo, pero a diferencia del ΔH de la miosina, la actina no sufrió un decremento del ΔH por efecto del tiempo de congelación. Hipotéticamente, podríamos pensar que la actina sufre un rearreglo molecular, con la subsecuente formación de interacciones intermoleculares y/o agregados debido a la congelación-descongelación, pero no sufre desnaturalización subsecuente debido al tiempo de almacenamiento. Estos resultados sugieren que la actina posee una mayor estabilidad durante el almacenamiento que la miosina, lo que podría ser una respuesta de las diferencias en el tipo de interacciones que estabilizan a estas proteínas durante la congelación.

Por último, el efecto de la congelación-descongelación y la molienda sobre el ΔH_{total} tuvo un comportamiento similar al de la miosina y actina. Lo anterior probablemente se deba a que las transiciones de la miosina y actina son las que tienen mayor contribución en la energía de transición de las proteínas del músculo (ΔH_{total}). Así mismo, debido a que el ΔH de la actina no sufrió cambios por el tiempo de almacenamiento, el decremento del ΔH_{total} fue principalmente influenciado por la reducción del ΔH de la miosina.

Los resultados obtenidos mediante CDB demostraron que las proteínas del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) son estables térmicamente durante la congelación y almacenamiento en congelación. Lo anterior, debido a que durante la congelación bajo las distintas condiciones aplicadas, las proteínas no se desestabilizaron térmicamente (no se redujeron las T_{max}) ni ocurre una fuerte desnaturalización de la actina y miosina debido a la molienda y almacenamiento en congelación. Sin embargo, se observó un efecto de agregación durante el proceso de congelación-descongelación.

Hidrofobicidad de Superficie

La medición de la hidrofobicidad de superficie (SoANS) de las proteínas a través del ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS), es un método usualmente utilizado para la evaluación del proceso plegamiento/desplegamiento de las proteínas (Schönbrunn *et al.*, 2000).

La miosina nativa tiene concentrados grupos hidrofóbicos en el corazón de la hélice y en la región globular de la molécula o cabeza, mientras la superficie hay una menor proporción de estos (Carvajal *et al.*, 2005). Durante la congelación, la reducción de la temperatura desestabiliza las interacciones hidrofóbicas de las proteínas provocando que estas tiendan a desdoblarse (desnaturalizarse) y a exponer estos grupos hidrofóbicos (Park, 1994).

En la Tabla 6 se muestran los valores de hidrofobicidad de superficie (SoANS) del músculo de calamar fresco (F) y los diferentes tratamientos congelados (MC1, EC1, MC30 y EC30). Se observó que las proteínas del músculo fresco experimentaron un incremento ($p \leq 0.05$) de la SoANS desde 0.120 a 0.141 después de congelar el músculo entero por 1 día (contraste C1). Este incremento debido a la congelación-descongelación del músculo fue seguido de otro incremento ($p \leq 0.05$) promedio del 17.2 % después de 30 días de almacenamiento con respecto al día 1 (contraste 3).

Se ha demostrado en diferentes estudios que el incremento inicial de la SoANS de las proteínas durante la congelación se debe a la exposición de grupos hidrofóbicos debido a la desnaturalización proteica (Niwa *et al.*, 1986), mientras que la agregación de las proteínas vía interacciones hidrofóbicas provoca un decremento. La evolución de la SoANS de las proteínas durante el almacenamiento depende del balance desnaturalización-agregación (Thawornchinsombut y park, 2006).

Los resultados obtenidos sugieren que las proteínas del músculo de calamar sufrieron un desdoblamiento debido a la congelación y tiempo de almacenamiento

(contrastes C1 y C3), lo que se reflejó en un incremento en la SoANS (Tabla 6). No obstante, los resultados de CDB revelaron que el valor de ΔH_{total} se incrementó por efecto de la congelación-descongelación, lo que apunta a la formación de interacciones intra y/o intermoleculares, lo que debería reflejarse en un decremento de la SoANS. Sin embargo, lo anterior puede deberse a que estas interacciones podrían ser de naturaleza reversible (no-covalente), por lo que las condiciones del buffer de extracción de las proteínas musculares para realizar la medición de la SoANS (pH=6.2; $I \approx 0.53$ M), podrían disociar los supuestos agregados, lo que explicaría el incremento de la hidrofobicidad. No obstante, otros factores podrían estar involucrados en la respuesta del ΔH_{total} y de la SoANS, por lo que este supuesto requiere más investigación al respecto.

Los valores de SoANS de las proteínas del músculo fueron mayores después de 30 días de almacenamiento comparado con el día 1. Este incremento de la SoANS durante el almacenamiento indica que la tasa de desnaturalización fue mayor a la tasa de agregación o que no hubo formación de agregados. Estos resultados son consistentes con los de CDB, donde se observó un decremento del ΔH_{total} y ΔH de la miosina durante el almacenamiento en congelación, por lo que el incremento de la SoANS puede deberse posiblemente a la desnaturalización de la miosina.

La hidrofobicidad de las proteínas del músculo MC en promedio fue menor ($p \leq 0.05$) (cerca de un 7 %) con respecto a la del músculo EC (contraste C2). Esto indica que las proteínas del músculo MC sufrieron una reducción de la SoANS por agregación durante la congelación por efecto del proceso de molienda. Estos resultados, asociados a que los valores de ΔH revelan una mayor desnaturalización (menor valor de ΔH) en el músculo MC con respecto al EC (tanto al día 1 como al día 30) (Tabla 6), parece indicar que el proceso de molienda inicialmente pudiera producir una parcial desnaturalización de la proteína con la subsecuente agregación debido a la congelación.

Mignino *et al.*, (2008) mencionan que en la mayoría de los estudios acerca de la relación entre la estructura-función de las proteínas de alimentos, se enfatiza la importancia de la hidrofobicidad de superficie en las propiedades funcionales

cuando diferentes tratamientos y/o procesos son aplicados. En este estudio, la evaluación de la hidrofobicidad resultó una técnica muy sensible para medir los cambios a nivel estructural de las proteínas del músculo de calamar bajo las condiciones de manejo. Sin embargo, no se encontró una relación aparente entre la hidrofobicidad de las proteínas del músculo y la capacidad gelificante. Esto indica que los cambios que ocurrieron en las proteínas de calamar a nivel estructural (desnaturalización y formación de interacciones) debido a la congelación, molienda y almacenamiento, no tuvieron un impacto significativo en la capacidad gelificante del músculo.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la capacidad gelificante del músculo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) no se vio afectada por la congelación y almacenamiento en congelación durante 30 días. Lo anterior, independientemente si el músculo fue congelado entero o molido y a pesar de las drásticas condiciones de almacenamiento, que incluyen una velocidad de congelación lenta y una temperatura de almacenamiento relativamente elevada.

Durante la congelación se observaron cambios evidentes de las proteínas presentes en el músculo de calamar a nivel estructural. Estos cambios, se asociaron principalmente a una parcial desnaturalización de las proteínas debido a la congelación-descongelación, tiempo de almacenamiento y molienda. Sin embargo, estos cambios no tuvieron un impacto significativo en la capacidad gelificante del músculo.

La estabilidad de la capacidad gelificante del músculo frente a la congelación, probablemente esté relacionada a la estabilidad térmica de las proteínas musculares, dado que ésta no se vio afectada negativamente por las diferentes condiciones de almacenamiento y manejo en congelación. Por el contrario, se observó un incremento en la estabilidad térmica de la actina y tendencias hacia incrementarse la estabilidad térmica de la miosina, lo cual puede ser un efecto a la probable formación de interacciones intermoleculares no-covalentes.

Los hallazgos encontrados en el presente estudio comprueban la hipótesis planteada y proyectan nuevas oportunidades para el manejo y almacenamiento del músculo de calamar gigante como materia prima. Lo anterior podría ser un parte aguas en la manera en que tradicionalmente se maneja el calamar, debido a que una práctica común de la industria procesadora incluye la adición de aditivos, la congelación rápida de la materia prima y su mantenimiento a temperaturas bajas durante su almacenamiento, prácticas cuyo fin es evitar la desnaturalización-agregación de las proteínas y así mantener las propiedades funcionales del

músculo durante el almacenamiento en congelación. Sin embargo, estas estrategias de manejo tienen un fuerte impacto en el costo final del producto terminado.

En este sentido, la estabilidad funcional de las proteínas del músculo de calamar gigante y el hecho de que este no requiera de estabilizantes para su congelación (lenta o rápida) y almacenamiento (molido o entero), permite la elaboración de productos con valor agregado con un menor costo de elaboración. Lo anteriormente planteado, aunado al bajo costo del calamar gigante como materia prima y al reciente desarrollo de nuevas tecnologías enfocadas a su aprovechamiento, podría tener implicaciones económicas favorables si se logra cristalizar a nivel productivo.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, J. A. (1972). Sensory assesment of food texture. Food Technology, 26, 40-49.

Abugoch, L., Guarda, A., Pérez, L. M., & Donghi, I. (2000). Caracterización funcional y bioquímica de la carne del manto de jibia (Dosidicus gigas). Arch Latinoamer Nutr, 50(4), 380–386.

Alizadeh-Pasdar, N., & Li-Chan, E. C. Y. (2000). Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes. Journal of Agricultural and food Chemistry, 48(2), 328-334.

Álvarez, C., Couso, I., & Tejada, M. (1999). Thermal gel degradation (modori) in sardine surimi gels. Journal of food science, 64(4), 633-637.

AOAC. (2000). Método 39.1.02: Moisture in Meat; 39.1.08: Fat (Crude) in Meat and Meat Products; 39.1.09: Ash of Meat; 39.1.15: Nitrogen in Meat. In W. Horwitz (Ed.), Official methods of analysis of AOAC International). Gaithersburg, MD: AOAC international

Atayeter, S., & Ercoşkun, H. (2011). Chemical composition of European squid and effects of different frozen storage temperatures on oxidative stability and fatty acid composition. Journal of Food Science and Technology, 48(1), 83-89.

Avanza, M. V., Puppo, M. C., & Añón, M. C. (2005). Structural characterization of amaranth protein gels. Journal of food science, 70(3), E223-E229.

Babbitt, J. K., Crawford, D. L., & Law, D. K. (1972). Decomposition of trimethylamine oxide and changes in protein extractability during frozen storage of minced and intact hake (Merluccius productus) muscle. Journal of Agricultural and food Chemistry, 20(5), 1052-1054.

Badii, F., & Howell, N. K. (2002). Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. Food Hydrocolloids, 16(4), 313-319.

Bazzino, G., Salinas-Zavala, C., & Markaida, U. (2007). Variabilidad en la estructura poblacional del calamar gigante (Dosidicus gigas) en Santa Rosalía, región central del Golfo de California. Ciencias Marinas, 33(2), 173-186.

Benjakul, S., & Bauer, F. (2000). Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze–thaw cycles. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(8), 1143-1150.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Thongkaew, C., & Tanaka, M. (2005). Effect of frozen storage on chemical and gel-forming properties of fish commonly used for surimi production in Thailand. Food Hydrocolloids, 19(2), 197-207.

Berg, J. M., Stryer, L., & Tymoczko, J. L. (2008). Motores Moleculares. In Bioquímica). Barcelona, España: Reverte Editorial Sa.

Bourne, M. C. (2002). Principles of Objective Texture Measurement. In M. C. Bourne (Ed.), Food texture and viscosity: concept and measurement 2ed.): Academic Pr.

Boyer, C., Joandel, S., Roussilhes, V., Culioli, J., & Ouali, A. (1996). Heat Induced Gelation of Myofibrillar Proteins and Myosin from Fast and Slow Twitch Rabbit Muscles. Journal of food science, 61(6), 1138-1143.

Brewer, M., Peterson, W., Carr, T., McCusker, R., & Novakofski, J. (2005). Thermal gelation properties of myofibrillar protein and gelatin combinations. Journal of Muscle Foods, 16(2), 126-140.

Buchert, J., Ercili-Cura, D., Ma, H., Gasparetti, C., Monogioudi, E., Faccio, G., Mattinen, M., Boer, H., Partanen, R., & Selinheimo, E. (2010). Crosslinking food proteins for improved functionality. Annual Review of Food Science and Technology, 1, 113-138.

Campo-Deaño, L., Tovar, C. A., & Borderías, J. (2010). Effect of several cryoprotectants on the physicochemical and rheological properties of suwari gels from frozen squid surimi made by two methods. Journal of Food Engineering, 97(4), 457-464.

Careche, M., & Li-Chan, E. C. Y. (1997). Structural changes in cod myosin after modification with formaldehyde or frozen storage. Journal of food science, 62(4), 717-723.

Carvajal, P. A., Lanier, T. C., MacDonald, G. A., & Park, J. W. (2005). Stabilization of proteins in surimi. Surimi and surimi seafood 2ed., 163-225.

Castellanos, C., & Hernández, G. (2005). Efecto del almacenamiento en congelación sobre las proteínas miofibrilares del músculo de calamar. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis.

Castro-Briones, M., Calderon, G. N., Velazquez, G., Salud-Rubio, M., Vázquez, M., & Ramírez, J. A. (2009). Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. Journal of Food Process Engineering, 32(2), 221-234.

Chung, Y. C., Richardson, L., & Morrissey, M. T. (1993). Effects of pH and NaCl on gel strength of Pacific whiting surimi. Journal of aquatic food product technology, 2, 19-35.

Cifuentes-Lemus, J. L., Torres-García, P., & Frías, M. (1997). El Océano y sus Recursos. Pesquerías. México: Fondo de Cultura Económica.

Conapesca. (2000). Anuario estadístico de pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/cona_historial_de_anuarios_1987__2000, México 275p.

Conapesca. (2008). Anuario estadístico de pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2008, México 155p.

Conapesca. (2009). Anuario estadístico de pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009_capitulo_i_preliminar, México 155p.

Conapesca. (2010). Anuario estadístico de pesca. http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2010, Base de datos.

Cortés-Ruiz, J. A., & Pacheco-Aguilar, R. (2009). Concentrados proteicos funciononales. In I. Guerrero-Legarreta, M. R. Rosmini & R. E. Armenta (Eds.), Tecnología de productos de origen acuático, (pp. 475-496). México D. F.: LIMUSA.

Cortés-Ruiz, J. A., Pacheco-Aguilar, R., Elena, L. S., Carvallo-Ruiz, G., & Garcia-Sanchez, G. (2008). Production and functional evaluation of a protein concentrate from giant squid (Dosidicus gigas) by acid dissolution and isoelectric precipitation. Food chemistry, 110(2), 486-492.

Damodaran, S., Parkin, K., & Fennema, O. R. (2008). Fennema's food chemistry: CRC Press.

Davies, J. R., Ledward, D. A., Bardsley, R. G., & Poulter, R. (1994). Species dependence of fish myosin stability to heat and frozen storage. International Journal of Food Science & Technology, 29(3), 287-301.

De La Cruz-González, F. J., Aragón-Noriega, E. A., Urciaga-García, J. I., Salinas-Zavala, C. A., Cisneros-Mata, M. A., & Beltrán-Morales, L. F. (2007). Análisis socioeconómico de las pesquerías de camarón y calamar gigante en el noroeste de México. 32(3), 144-150.

De La Fuente-Betancourt, G., García-Carreño, F., Navarrete, D. E. L. T., & Córdova-Murueta, J. (2009). Effect of pH and temperature on jumbo squid proteins. Journal of food biochemistry, 33(2), 260-272.

De La Fuente-Betancourt, G., García-Carreño, F., Navarrete, D. E. L. T., Córdova-Murueta, J. H., & , & Lugo-Sánchez, M. E. (2009). Protein solubility and production of gels from jumbo squid. Journal of food biochemistry, 33(2), 273-290.

De La Fuente-Betancourt, G., García-Carreño, F., & Toro, M. Á. N. (2008). Effect of storage at 0° C on mantle proteins and functional properties of jumbo squid. International Journal of Food Science & Technology, 43(7), 1263-1270.

Delgado, A. E., Sun, D.-W., & Rubiolo, A. C. (2006). Thermal Physical Properties of Foods. Thermal Food Processing. New technologies and quality issues. Taylor & Francis Group. 3-34.

Dihort-García, G., Ocaño-Higuera, V., Ezquerra-Brauer, J., Lugo-Sánchez, M., Pacheco-Aguilar, R., Barrales-Heredia, S., & Marquez-Rios, E. (2011). Producción y evaluación funcional de un concentrado proteico de calamar gigante (Dosidicus gigas) obtenido mediante disolución alcalina.

Dublán-García, G. O. (2006). Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos del manto de calamar gigante (Dosidicus gigas) durante el almacenamiento en refrigeración o congelación. Universidad Autónoma Metropolitana. Tesis de doctorado.

Dublán-García, O., Cruz Camarillo, R., Guerrero Legarreta, I., & Ponce Alquicira, E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (Dosidicus gigas) mantle muscle. Journal of Muscle Foods, 17(3), 291-310.

Egelandsdal, B., Fretheim, K., & Samejima, K. (1986). Dynamic rheological measurements on heat induced myosin gels: Effect of ionic strength, protein concentration and addition of adenosine triphosphate or pyrophosphate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 37(9), 915-926.

Epstein, H. F., Miller, D. M., Ortiz, I., & Berliner, G. C. (1985). Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure. The Journal of cell biology, 100(3), 904.

Evans, J. A. (2008). Frozen food science and technology: Wiley Online Library.

Ezquerra Brauer, J., Haard, N. F., Ramírez Olivas, R., Olivas Burrola, H., & Velazquez Sánchez, C. J. (2002). Influence of harvest season on the proteolytic activity of hepatopancreas and mantle tissues from jumbo squid (dosidicus gigas). Journal of food biochemistry, 26(5), 459-475.

Félix-Armenta, A., Ramírez-Suárez, J. C., Pacheco-Aguilar, R., Díaz-Cinco, M. E., Cumplido-Barbeitia, G., & Carvallo-Ruiz, G. (2009). Jumbo squid (Dosidicus gigas) mantle muscle gelled emulsified type product: formulation, processing and physicochemical characteristics. International Journal of Food Science & Technology, 44(8), 1517-1524.

Fennema, O. R. (2000). Agua y hielo. In O. R. Fennema (Ed.), Química de los alimentos.). Zaragoza, Spain: Acribia.

Foegeding, E. A., Lanier, T. C., & Hultin, H. O. (2000). Características de los tejidos musculares comestibles. In O. R. Fennema (Ed.), Química de los alimentos). Zaragoza, Spain: Acribia, S. A.

Ganesh, A., Dileep, A., Shamasundar, B., & Singh, U. (2006). Gel forming ability of common carp fish (Cyprinus carpio) meat: effect of freezing and frozen storage. Journal of food biochemistry, 30(3), 342-361.

Gómez-Guillén, M., Hurtado, J., & Montero, P. (2002). Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle. Journal of food science, 67(7), 2491-2496.

Gómez-Guillén, M., Martí de Castro, M. A., & Montero, P. (1997b). Rheological and microstructural changes in gels made from high and low quality sardine

mince with added egg white during frozen storage. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 205(6), 419-428.

Gómez-Guillén, M., Martínez Alvarez, O., & Montero, P. (2003). Functional and thermal gelation properties of squid mantle proteins affected by chilled and frozen storage. Journal of food science, 68(6), 1962-1967.

Gómez-Guillén, M. C., Borderias, A. J., & Montero, P. (1997). Salt, nonmuscle proteins, and hydrocolloids affecting rigidity changes during gelation of giant squid (Dosidicus gigas). Journal of Agricultural and food Chemistry, 45(3), 616-621.

Gómez-Guillén, M. C., Martí de Castro, M. A., & Montero, P. (1997). Rheological and microstructural changes in gels made from high and low quality sardine mince with added egg white during frozen storage. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 205(6), 419-428.

Grinberg, V. Y., Burova, T. V., & Tolstoguzov, V. B. (2009). Thermal Analysis of Denaturation and Aggregation of Proteins and Protein Interactions in a Real Food System. In G. Kaletunç (Ed.), Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food Systems, (pp. 87-118). 2121 State Avenue, Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell and the Institute of Food Technologists.

Hastings, R. J., Rodger, G. W., Park, R., Matthews, A. D., & Anderson, E. M. (1985). Differential scanning calorimetry of fish muscle: the effect of processing and species variation. Journal of food science, 50(2), 503-506.

Hernández-Herrera, A., Morales, E., Nevárez, M., Balmori, A., & Rivera, G. (1996). Distribución de tallas y aspectos reproductivos del calamar gigante (Dosidicus gigas, DOrbigny, 1835) en el Golfo de California, México. Ciencia Pesquera (12), 85-89.

Herrera, J. J., Pastoriza, L., Sampedro, G., & Cabo, M. L. (1999). Effect of various cryostabilizers on the production and reactivity of formaldehyde in frozen-

stored minced blue whiting muscle. Journal of Agricultural and food Chemistry, 47(6), 2386-2397.

Howell, B., Matthews, A., & Donnelly, A. (1991). Thermal stability of fish myofibrils: a differential scanning calorimetric study. International Journal of Food Science & Technology, 26(3), 283-295.

Hurling, R., & McArthur, H. (1996). Thawing, refreezing and frozen storage effects on muscle functionality and sensory attributes of frozen cod (Gadus morhua). Journal of food science, 61(6), 1289-1296.

Huss, H. H., Boerresen, T., Dalgaard, P., Gram, L., & Jensen, B. (1998). Quality and quality changes in fresh fish; El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO, Documento Tecnico de Pesca (FAO).

Jiang, S. T., Ho, M. L., & Lee, T. C. (1985). Optimization of the freezing conditions on mackerel and amberfish for manufacturing minced fish. Journal of food science, 50(3), 727-732.

Kang, E. J., Hunt, A. L., & Park, J. W. (2008). Effects of Salinity on Physicochemical Properties of Alaska Pollock Surimi after Repeated Freeze–Thaw Cycles. Journal of food science, 73(5), C347-C355.

Kim, B. Y., Park, J. W., & Yoon, W. (2005). Rheology and texture properties of surimi gels. Surimi and surimi seafood 2ed., 491-582.

Kolbe, E. (2005). Freezing technology. Surimi and surimi seafood 2ed., 325-371.

Kovačević, D., & Mastanjević, K. (2011). Cryoprotective effect of trehalose and maltose on washed and frozen stored beef meat. Czech J. Food Sci. Vol, 29(1), 15-23.

Lanier, T. C., Carvajal, P., & Yongsawatdigul, J. (2005). Surimi gelation chemistry. Surimi and surimi seafood 2ed., 436-477.

Leelapongwattana, K., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Howell, N. K. (2005). Physicochemical and biochemical changes during frozen storage of minced flesh of lizardfish (Saurida micropectoralis). Food chemistry, 90(1-2), 141-150.

Leelapongwattana, K., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Howell, N. K. (2008). Effect of some additives on the inhibition of lizardfish trimethylamine N oxide demethylase and frozen storage stability of minced flesh. International Journal of Food Science & Technology, 43(3), 448-455.

Licciardello, J. J., Ravesi, E. M., & Allsup, M. G. (1980). Frozen Storage Characteristics of Whiting Blocks.

Liu, R., Zhao, S., Xiong, S., Xie, B., & Qin, L. (2008). Role of secondary structures in the gelation of porcine myosin at different pH values. Meat Science, 80(3), 632-639.

Llorca, E., Hernando, I., Pérez-Munuera, I., Fiszman, S. M., & Lluch, Á. M. (2001). Effect of frying on the microstructure of frozen battered squid rings. European Food Research and Technology, 213(6), 448-455.

Luna-Raya, M., Aragón Noriega, E. A., & Salinas-Zavala, C. A. (2009). Análisis del consumo de calamar gigante en el noroeste de México. Región y sociedad, 21(46), 145-157.

Luna-Raya, M., Urciaga-García, J., Salinas-Zavala, C. A., Cisneros-Mata, M. A., & Beltrán-Morales, L. F. (2006). Diagnóstico del consumo del calamar gigante en México y en Sonora. Economía, sociedad y territorio, 6(22), 535-560.

MacDonald, G. A., Wilson, N., & Lanier, T. (1990). Stabilised mince: an alternative to the traditional surimi process. Chilling and Freezing of New Fish Products. Proceedings of Commission C, 57-63.

Magnussen, O. M., Hemmingsen, A. K. T., Hardarsson, V., Nordtvedt, T. S., & Eikevik, T. M. (2008). Freezing of fish. Frozen Food Science and Technology, 151-164.

Mahawanich, T., Lekhavichitr, J., & Duangmal, K. (2010). Gel properties of red tilapia surimi: effects of setting condition, fish freshness and frozen storage. International Journal of Food Science & Technology, 45(9), 1777-1786.

Mandigo, R. W., & Osburn, W. N. (1996). Cured and processed meats: Marcel Dekker Inc.: New York.

Márquez Ríos, E., Morán Palacio, E., Lugo Sánchez, M., Ocano Higuera, V., & Pacheco Aguilar, R. (2007). Postmortem biochemical behavior of giant squid (Dosidicus gigas) mantle muscle stored in ice and its relation with quality parameters. Journal of food science, 72(7), C356-C362.

Matos, E., Silva, T. S., Tiago, T., Aureliano, M., Dinis, M. T., & Dias, J. (2011). Effect of harvesting stress and storage conditions on protein degradation in fillets of farmed gilthead seabream (Sparus aurata): A differential scanning calorimetry study. Food chemistry, 126(1), 270-276.

Matsumoto, J. J. (1979). Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. Proteins at Low Temperatures, 206-224.

Medina-Vivanco, M., Sobral, P., Sereno, A., & Hubinger, M. (2004). Thermal analysis of osmotically dehydrated tilapia muscle: effect of sodium chloride and sucrose on denaturation temperature of myofibrillar proteins. In, vol. 100 (pp. 1859–1867).

Mendes, R., Gómez-Guillén, C., & Montero, P. (1997). Effect of a new vacuum leaching technology on the textural characteristics of sardine mince. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A, 204(2), 113-120.

Mignino, L. A., Crupkin, M., & Paredi, M. E. (2008). Surface hydrophobicity and functional properties of myofibrillar proteins of mantle from frozen-stored

squid (Illex argentinus) caught either jigging machine or trawling. LWT-Food Science and Technology, 41(4), 678-685.

Moral, A., Morales, J., Ruíz Capillas, C., & Montero, P. (2002). Muscle protein solubility of some cephalopods (pota and octopus) during frozen storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82(6), 663-668.

Morales, J., Montero, P., & Moral, A. (2000). Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. Journal of Agricultural and food Chemistry, 48(6), 2142-2148.

Moreno, H. M., Cardoso, C., Solas, M. T., & Borderías, A. J. (2009). Improvement of cold and thermally induced gelation of giant squid (Dosidicus gigas) surimi. Journal of aquatic food product technology, 18(4), 312-330.

Nesvadba, P. (2008). Thermal Properties and Ice Crystal Development in Frozen Foods. Frozen Food Science and Technology, 1-25.

Nevárez-Martínez, M. O., Hernández-Herrera, A., Morales-Bojórquez, E., Balmori-Ramírez, A., Cisneros-Mata, M. A., & Morales-Azpeitia, R. (2000). Biomass and distribution of the jumbo squid (Dosidicus gigas; d'Orbigny, 1835) in the Gulf of California, Mexico. Fisheries research, 49(2), 129-140.

Nigmatullin, C. M., Nesis, K. N., & Arkhipkin, A. (2001). A review of the biology of the jumbo squid Dosidicus gigas (Cephalopoda: Ommastrephidae). Fisheries research, 54(1), 9-19.

Niwa, E., Kohda, S., Kanoh, S., & Nakayama, T. (1986). Exposure of hydrophobic amino acid residues from actomyosin on freezing-reconfirmation by fluorometry. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries [Nihon Suisan Gakkai-shi], 52(6), 1039-1042.

O´Shea. (2007). Cephalopod Science Forum. http://www.tonmo.com/science/public/giantsquidfacts.php.

Ojeda, Y. (2011). Industrializarán calamar en Guaymas. El imparcial, 28 de Junio de 2011. http://www.elimparcial.com/EdicionEnLinea/Notas/Noticias/28062011/525166.aspx.

Otwell, W. S., & Giddings, G. G. (1980). Scanning electron microscopy of squid Loligo pealei: raw, cooked and frozen mantle. Marine Fisheries Review, 42, 67-72.

Palafox-Carlos, H., Córdova-Murueta, J. H., Navarrete del Toro, M. A., & García-Carreño, F. L. (2009). Protein isolates from jumbo squid (Dosidicus gigas) by pH-shift processing. Process Biochemistry, 44(5), 584-587.

Paredi, M. E., & Crupkin, M. (1997). Biochemical properties of actomyosin from frozen stored mantles of squid (Illex argentinus) at different sexual maturation stages. Journal of Agricultural and food Chemistry, 45(5), 1629-1632.

Paredi, M. E., Davidovich, L. A., & Crupkin, M. (1999). Thermally induced gelation of squid (Illex argentinus) actomyosin. Influence of sexual maturation stage. Journal of Agricultural and food Chemistry, 47(9), 3592-3595.

Paredi, M. E., Roldán, H. A., & Crupkin, M. (2006). Changes in myofibrillar proteins and lipids of squid (Illex argentinus) during frozen storage. Journal of food biochemistry, 30(5), 604-621.

Park, J. W. (1994). Cryoprotection of muscle proteins by carbohydrates and polyalcohols: a review. Journal of aquatic food product technology, 3(3), 23-41.

Park, J. W. (2005). Ingredient Technology for Surimi and Surimi Seafood. Surimi and surimi seafood 2ed., 649-707.

Park, J. W., & Lin, T. M. J. (2005). Surimi: manufacturing and evaluation. Surimi and surimi seafood, 33-106.

Pérez-Mateos, M., Lourenço, H., Montero, P., & Borderias, A. (1997). Rheological and biochemical characteristics of high-pressure and heat-induced gels from blue whiting (Micromesistius poutassou) muscle proteins. Journal of Agricultural and food Chemistry, 45(1), 44-49.

Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, C. M. (2002). Addition of microbial transglutaminase and protease inhibitors to improve gel properties of frozen squid muscle. European Food Research and Technology, 214(5), 377-381.

Ponce-Alquicira, A. E., Dublán-García, G. O., & Vázquez, Z. Z. (2009). Calamar. In I. Guerrero-Legarreta, M. R. Rosmini & R. E. Armenta (Eds.), Tecnología de productos de origen acuático, (pp. 75-92). México D. F.: LIMUSA.

Poulter, R., Ledward, D., Godber, S., Hall, G., & Rowlands, B. (1985). Heat stability of fish muscle proteins. International Journal of Food Science & Technology, 20(2), 203-217.

Puppo, M. C., Lupano, C. E., & Anon, M. C. (1995). Gelation of soybean protein isolates in acidic conditions. Effect of pH and protein concentration. Journal of Agricultural and food Chemistry, 43(9), 2356-2361.

Ramírez-Suarez, J. C., Ibarra-Leon, L. R., Pacheco-Aguilar, R., & Lugo-Sanchez, M. (2008). Physicochemical and functional changes in jumbo squid (Dosidicus gigas) mantle muscle during ice storage. Food chemistry, 111(3), 586-591.

Reggiani, C., & Bottinelli, R. (2008). Myosin II: Sarcomeric myosins, the motors of contraction in cardiac and skeletal muscles. In L. M. Coluccio (Ed.), Myosins, (pp. 125-169). Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Reynolds, J., Park, J. W., & Choi, Y. J. (2002). Physicochemical properties of Pacific whiting surimi as affected by various freezing and storage conditions. Journal of food science, 67(6), 2072-2078.

Rocha-Estrada, J., Córdova-Murueta, J., & García-Carreno, F. (2010). Functional Properties of Protein from Frozen Mantle and Fin of Jumbo Squid Dosidicus gigas in Function of pH and Ionic Strength. Food Science and Technology International, 16(5), 451.

Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J., & Montero, P. (2002). The effect of frozen storage on the functional properties of the muscle of volador (Illex coindetii). Food chemistry, 78(2), 149-156.

Ruiz-Capillas, C., Moral, A., Morales, J., & Montero, P. (2003). Viscosity and emulsifying capacity in pota and octopus muscle during frozen storage. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83(11), 1168-1175.

Salinas-Zavala, C. A., Coop, S. C., Rebollo, A. M., Hernández, S. S., Verdugo, C. S., Angulo, M. G., Quintana, E. F., & Morales, L. F. B. (2003). Alternativas para fortalecer la cadena productiva de la pesquería de calamar gigante. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, BCS, México.

Sánchez-Alonso, I., Careche, M., & Borderías, A. J. (2007). Method for producing a functional protein concentrate from giant squid (Dosidicus gigas) muscle. Food chemistry, 100(1), 48-54.

Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Luger, K., Kabsch, W., & Amrhein, N. (2000). Structural basis for the interaction of the fluorescence probe 8-anilino-1-naphthalene sulfonate (ANS) with the antibiotic target MurA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97(12), 6345.

Shahidi, F. (2007). Maximising the value of marine by-products. New York: CRC Press LLC.

Sikorski, Z. E. (2001). Functional properties of proteins in food systems. In Z. E. Sikorski (Ed.), Chemical and Functional Properties of Food Proteins, (pp. 113-136): Lancaster - Basel: Technomic, Publishing Co., Inc.

Sikorski, Z. E., & Borderias, J. (1994). Collagen in the muscles and skins of marine animals. New York: Chapman and Hall.

Slabyj, B. M., Ramnsdell, G. E., & True, R. H. (1981). Quality of Squid, Illex illecebrosus, Mantles Canned in Oil. Marine Fisheries Review, 43(6), 17-20.

Smith, D. M. (2001). Functional properties of muscle proteins in processed poultry products. Poultry Meat Processing, 11, 181-195.

Sotelo, C. G., Piñeiro, C., Pérez-Martín, R. I., & Gallardo, J. M. (2000). Analysis of fish and squid myofibrillar proteins by capillary sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis: actin and myosin quantification. European Food Research and Technology, 211(6), 443-448.

Srinivasan, S., Xiong, Y. L., & Blanchard, S. P. (1997). Effects of freezing and thawing methods and storage time on thermal properties of freshwater prawns (Macrobrachium rosenbergii). Journal of the Science of Food and Agriculture, 75(1), 37-44.

Strambini, G. B., & Gabellieri, E. (1996). Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding. Biophysical journal, 70(2), 971-976.

Sun, X. D., & Holley, R. A. (2011). Factors Influencing Gel Formation by Myofibrillar Proteins in Muscle Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10(1), 33-51.

Sun, X. D., & Holley, R. A. (2011). Factors Influencing Gel Formation by Myofibrillar Proteins in Muscle Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 10(1), 33-51.

Tanikawa, E. M., Motohiro, T., & Akiba, M. (1985). Marine products in Japan. Tokyo, Japan: Koseisha Koseikaku Co. Ltd.

Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Decker, E. A. (2006). The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties

of cuttlefish (Sepia pharaonis) subjected to multiple freeze-thaw cycles. Food chemistry, 95(4), 591-599.

Thanonkaew, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Decker, E. A. (2006). The effect of metal ions on lipid oxidation, colour and physicochemical properties of cuttlefish (Sepia pharaonis) subjected to multiple freeze-thaw cycles. Food chemistry, 95(4), 591-599.

Thawornchinsombut, S., & Park, J. W. (2006). Frozen stability of fish protein isolate under various storage conditions. Journal of food science, 71(3), C227-C232.

Torrejón, P., del Mazo, M. L., Tejada, M., & Careche, M. (1999). Aggregation of minced hake during frozen storage. European Food Research and Technology, 209(3), 209-214.

Torres, J., Chen, Y., Rodrigo-Garcia, J., Jaczynski, J., & Shahidi, F. (2007). Recovery of by-products from seafood processing streams. Maximising the value of marine by-products, 65-90.

Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar, R., Sotelo-Mundo, R., Rouzaud-Sández, O., & Ezquerra-Brauer, J. (2008). Caracterización parcial del colágeno extraído a partir del manto, aleta y tentáculos de calamar gigante (dosidicus gigas). CYTA-Journal of Food, 6(2), 101-108.

Totosaus, A., Montejano, J. G., Salazar, J. A., & Guerrero, I. (2002). A review of physical and chemical protein gel induction. International Journal of Food Science & Technology, 37(6), 589-601.

Valencia-Pérez, A. Z., García-Morales, M. H., Cárdenas-López, J. L., Herrera-Urbina, J. R., Rouzaud-Sández, O., & Ezquerra-Brauer, J. M. (2008). Effect of thermal process on connective tissue from jumbo squid (Dosidicus gigas) mantle. Food chemistry, 107(4), 1371-1378.

Velázquez-Abunader, J., Nevárez-Martínez, M., & Hernández-Herrera, A. (2010). Distribución de tallas y condición reproductiva del calamar gigante dosidicus gigas (dorbigny, 1835) en el Golfo de California.

Walstra, P. (2002). Physical chemistry of foods (Vol. 121). Inc. 270 Madison Avenue, New York: CRC Press.

Woyewoda, A. D., Shaw, S. J., Ke, P. J., & Burns, B. G. (1986). Recommended laboratory methods for assessment of fish quality. Minister of Supply and Services, Canada.

Yongsawatdigul, J., & Park, J. W. (2004). Effects of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. Journal of food science, 69(7), 499-505.

Zaritzky, N. E. (2008). Frozen Storage. In J. A. Evans (Ed.), Frozen Food Science and Technology). UK: Blackwell Publishing Ltd.